

Tímto svoluji k zapůjčení své diplomové práce pro studijní a vědecké potřeby a žádám, aby byla vedena řádná evidence vypůjčovateli. Všechna data a informace z ní převzaté musí být řádně ocitována.

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program:

BIOLOGIE

Studijní obor:

GENETIKA, MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A VIROLOGIE



**Pavel Dostalík**

Role acetylace proteinů v životním cyklu Polyomavirů

The role of proteins acetylation in life cycle of Polyomaviruses

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.6.2020

Podpis

Tato práce vznikla v letech 2017 - 2020 za finanční podpory Grantové agentury České republiky - grantu č. 16-07977S "Polyomaviry: Buněčné odpovědi na složky virové částice" a finančního daru Ligy proti rakovině, Praha.

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí naší laboratoře paní Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc., panu Mgr. Martinu Fraiberkovi, Ph.D za pomoc s elektronovou mikroskopií a poskytnutí VLP částic. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu naší laboratoře za veškerou pomoc a příjemné pracovní prostředí. Největší poděkování patří mé školitelce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za její nekonečnou trpělivost a pomoc při vypracovávání a sepisování této diplomové práce. Nakonec bych chtěl také poděkovat své rodině za pomoc a psychickou podporu během mého studia.



## **Abstrakt:**

Virová částice myšího polyomaviru je složená ze 3 strukturních proteinů: majoritního strukturního proteinu VP1 a minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3. Funkci řady proteinů mohou ovlivňovat jejich posttranslační modifikace. Tato práce se zaměřuje na to, jaký dopad mají acetylace strukturních proteinů na replikační cyklus MPyV. První část této práce se zabývá acetylací proteinu VP1. Podařilo se nám prokázat, že je tento protein acetylovaný ve virové částici a také to, že proces acetylace je závislý na přítomnosti minoritních proteinů. Také se nám podařilo prokázat, že pro infektivitu viru je důležitá HDAC6. Její nadprodukce snižuje infektivitu viru, stejný efekt jsme pozorovali také u viru izolovaného z HDAC6 KO buněk. Naše data naznačují, že VP1 protein je substrátem HDAC6. Podařilo se nám zjistit, že VP1 protein viru izolovaného z HDAC6 KO buněk je více acetylovaný ve srovnání s původním virem.

Ve druhé části jsme se zaměřili na N' terminální acetylaci proteinu VP3. Acetylaci VP3 proteinu na jeho N' konci byla už dříve popsána a jeho mutace zabráňující této acetylaci vede k tomu, že je takový MPyV neinfekční. Proto jsme chtěli zjistit, zda je N' terminální acetylaci důležitá pro stabilitu VP3 proteinu. Naše předběžné výsledky naznačují, že N' terminálně acetylovaný VP3 divokého typu je stabilnější ve srovnání s jeho neacetylovanou formou.

**Klíčová slova:** Myší polyomavirus, HDAC6, acetylaci, strukturní proteiny, posttranslační modifikace

## **Abstract**

Capsid of mouse polyomavirus (MPyV) is composed from three structural proteins: major structural protein VP1 and minor structural proteins VP2 and VP3. Posttranslational modifications may affect functions of proteins. This work deals with acetylation of MPyV structural proteins and its impact on the viral replication cycle. First part of the thesis is focused on acetylation of VP1. We showed that the VP1 protein is acetylated in viral particles and that interaction of VP1 with minor proteins supports VP1 acetylation. Further, we showed that cytoplasmatic deacetylase, histone deacetylase 6 (HDAC6), is important for virus infectivity. Overexpression of HDAC6 decreased MPyV infectivity, also decreased infectivity was exhibited by virus isolated from HDAC6 knock out cells. In addition, VP1 protein of virus from HDAC6 knock out cells was more acetylated in comparison with virus from parental cell line. These data suggest that VP1 is substrate for HDAC6.

Second part of the thesis is focused on the characterization of N-terminal acetylation of VP3 minor structural protein. It has been previously shown that VP3 protein is N-terminally acetylated and MyPV with mutated (unacetylated) form of VP3 protein is non-infectious. The main aim of this part is to prove the hypothesis that N-terminal acetylation is important for stability of VP3 protein. Our preliminary results suggest that wild type (acetylated) VP3 is more stable than unacetylated form of VP3 protein.

Key words: Mouse polyomavirus, HDAC6, acetylation, structural proteins, posttranslational modifications

## Seznam zkratek

Å = Ångström

A = alanin

AA = aminiokyselina

acetylCoA = Acetylkoenzym A

ADP = Adenosindifosfát

BKV = BK polyomavirus

Bp = páry (nukleotidových) bází

CsCl = chlorid césný

DAPI = 4', 6 – diamidino - 2 - fenyldol dihydrochlorid

DMEM = Eaglovo médium modifikované Dulbeccem

DNA = deoxyribonukleová kyselina

Ds = dvouvláknová

DTT = 1,4-dithiotreitol

*E. coli* = *Escherichia coli*

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

EGFP/GFP = zelený fluorescenční proteináza 6

ER = endoplazmatické retikulum

g = gram

GA = golgiho aparát

Gly = glycin

Glu = kyselina glutamová

GTP = Guanosintrifosfát

H = histidin

h = hodina

HAT = histon acetyl transferáza

HCL = kyselina chlorovodíková

HDAC6 = histon deacetyláza 6

HDAC5 = histon deacetyláza 5

HD = hydrofóbní doména

HIV = virus imunitní nedostatečnosti

Hpi = hodin po infekci

Hpt = hodin po transfekci

HTLV1 = virus lidské T buněčné leukemie

IAV = chřipka A

IL = interleukin

JCV = JC polyomavirus

KCl = chlorid draselný

kbp = tisíc párů (nukleotidových) bazí

kDa = kilodalton

KDAC = lyzin deacetyláza

KO = knock out

l = litr

LB = Lurita - Bertani médium

LT = velký tumorogenní antigen

Lys = lyzin

M = marker molekulových hmotností

MCPyV Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk

Met = metionin

min = minuta

ml = mililitr

MpYV = myší polyomavirus

mRNA = messengerová RNA

MT = střední tumorogenní antigen

MW = relativní molekulová hmotnost

NaCl = chlorid sodný

NAD = Nikotinamidadenin dinukleotid

NAT = N 'terminální acetyl transferáza

N'/C' = amino/karboxy konec

ND10 = jaderná doména 10

NLS = jaderný lokalizační signál

NES jaderný exportní signál

nm = nanometr

p300 = typ histon acetyltransferazy

p53 = protein 53

PAGE = polyakrylamidová gelová elektroforéza

PARP1 = poly(ADP-ribóza) polymeráza 1

PBS = fosfátový pufr

PCR = polymerázová řetězová reakce

pH = Záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku

PI = izoelektrický bod

pre - mRNA = prekurzorová mRNA

R = Arginin

RNA = ribonukleová kyseliny

rpm = otáčky za minutu

RPMI = Roswell Park Memorial Institute médium

S = Svedbergova jednotka

s = sekunda

SDS = dodecylsulfát sodný

ST = malý tumorogenní antigen

SV40 = polyomavirus SV40

Tris = tris(hydroxymethyl) aminomethan

TPN = total parental nutrition (bakteriální médium)

U = jednotka

V = valin

VLP = viru podobná částice

VP1 = Virový protein 1

VP2 = Virový protein 2

VP3 = Virový protein 3

VP35 = kofaktor polymerázy viru Ebola

VP 40 = matrixový protein viru Ebola

VSV = virus vezikulární stomatitidy

μl = mikrolitr

μg = mikrogram

°C = stupeň Celsia

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>2</b>
2.1	Polyomaviry	2
2.2	Organizace genomu myšího polyomaviru	2
2.3	Replikační cyklus viru	4
2.4	Role tumorogenních antigenů v replikačním cyklu polyomavirů	4
2.5	Virová částice	5
2.6	Viru podobné částice	7
2.7	Hlavní strukturní protein VP1	8
2.8	Vápník a jeho vliv na stabilitu virových částic	9
2.9	Posttranslační modifikace proteinu VP1	9
2.10	Buněčné proteiny interagující s VP1	11
2.11	Minoritní strukturní proteiny polyomavirů	14
2.12	Posttranslační modifikace minoritních proteinů	16
2.13	Význam acetylace buněčných a virových proteinů	17
2.14	Regulace aktivity proteinů acylací	19
2.15	Změny v acylacích proteinů při virové infekci hostitelských buněk	20
2.16	N' terminální acylace je evolučně konzervovaná	22
2.17	N' terminální acylace ovlivňuje stabilitu proteinů a jejich interakce s buněčnými strukturami	22
2.18	N' terminální acylace proteinů proteozomálních podjednotek	23
2.19	HDAC6	24
2.20	HDAC6 reguluje pohyblivost buněk	24
2.21	HDAC6 zasahuje do procesů nakládání se špatně sbalenými proteiny	25
2.22	HDAC6 ovlivňuje i autofágii	26
2.23	HDAC6 reguluje procesy vrozené imunity	27
2.24	HDAC6 má vliv na rozvoj nebo supresi rakovinného onemocnění	27
<b>3</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Materiály a metody</b>	<b>31</b>
4.1	Nejčastěji používané roztoky	31
4.2	Antibiotika	31
4.3	Bakteriální média	31
4.4	Média pro tkáňové kultury	32

<b>4.5</b>	<b>Buněčné linie</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Bakteriální kmeny</b>	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>Virus</b>	<b>32</b>
<b>4.8</b>	<b>Protilátky</b>	<b>33</b>
<b>4.9</b>	<b>Sekundární protilátky</b>	<b>33</b>
<b>4.10</b>	<b>Primery</b>	<b>34</b>
<b>4.11</b>	<b>Plazmidové konstrukty</b>	<b>34</b>
<b>4.12</b>	<b>Markery a barviva do gelů</b>	<b>35</b>
<b>4.13</b>	<b>Markery a barviva do gelů</b>	<b>35</b>
<b>4.14</b>	<b>Izolace DNA pomocí komerčního kitu Macherey - Nagel</b>	<b>35</b>
<b>4.15</b>	<b>Minipreparace plazmidové DNA kitem GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma - Aldrich)</b>	<b>36</b>
<b>4.16</b>	<b>Izolace DNA z virových částic</b>	<b>37</b>
<b>4.17</b>	<b>Stanovení koncentrace izolované DNA</b>	<b>37</b>
<b>4.18</b>	<b>Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami</b>	<b>37</b>
<b>4.19</b>	<b>Ligační reakce</b>	<b>38</b>
<b>4.20</b>	<b>Srážení DNA</b>	<b>38</b>
<b>4.21</b>	<b>Cílená mutageneze</b>	<b>38</b>
<b>4.22</b>	<b>PCR v reálném čase</b>	<b>39</b>
<b>4.23</b>	<b>Sekvenační analýza vzorků</b>	<b>40</b>
<b>4.24</b>	<b>Horizontální agarózová DNA elektroforéza</b>	<b>40</b>
<b>4.25</b>	<b>Příprava kompetentních bakterií</b>	<b>41</b>
<b>4.26</b>	<b>Kultivace bakterií na pevné médium</b>	<b>41</b>
<b>4.27</b>	<b>Kultivace bakterií v tekutém médiu</b>	<b>41</b>
<b>4.28</b>	<b>Uchovávání bakterií.</b>	<b>42</b>
<b>4.29</b>	<b>Transformace bakterií elektroporací</b>	<b>42</b>
<b>4.30</b>	<b>Transformace bakterií teplotním šokem</b>	<b>42</b>
<b>4.31</b>	<b>Pasážování savčích buněk linie 3T3, 3T6, WOP.</b>	<b>42</b>
<b>4.32</b>	<b>Pasážování hmyzích buněk linie Sf9</b>	<b>43</b>
<b>4.33</b>	<b>Transfekce savčích buněk pomocí přístroje Amaxa</b>	<b>43</b>
<b>4.34</b>	<b>Kultivace buněk na mikroskopických sklech</b>	<b>43</b>
<b>4.35</b>	<b>Cyklohexamidová assay</b>	<b>44</b>
<b>4.36</b>	<b>Infekce buněk 3T6</b>	<b>44</b>
<b>4.37</b>	<b>Infekce hmyzích buněk</b>	<b>44</b>
<b>4.38</b>	<b>Infekce buněk nasazených na sklíčka</b>	<b>45</b>
<b>4.39</b>	<b>Nepřímá imunofluorescence</b>	<b>45</b>



4.40	Příprava buněčných lyzátů	46
4.41	Měření koncentrace proteinů	46
4.42	Negativní barvení	46
4.43	Izolace virových částic	47
4.44	Izolace virům podobných částic	48
4.45	Imunoprecipitace virových a virům podobných částic	49
4.46	SDS elektroforéza a Western blot	49
4.47	Dot blot	51
4.48	Imunologické značení proteinů na membráně	51
4.49	Zhášení membrány	52
4.50	SDS elektroforéza v gradientovém gelu	52
5	Výsledky	53
5.1	Studium acetylce proteinu VP1	53
5.1.1	VP1 protein je acetylován ve virové částici	53
5.1.2	Vliv minoritních strukturních proteinů na efektivitu acetylce hlavního kapsidového proteinu	56
5.1.3	VP1 protein myšího polyomaviru je substrátem HDAC6	61
5.1.4	Vliv HDAC6 KO na infektivitu virových částic	65
5.1.5	Příprava plazmidu umožňujícího expresi lidské HDAC6	67
5.1.6	Nadprodukce HDAC6 - EGFP má negativní vliv na infektivitu myšího polyomaviru	71
5.2	Studium N' terminální acetylce	72
5.2.1	Příprava divokých a mutovaných virových genomů	73
5.2.2	Zastoupení minoritních proteinů v lyzátech buněk transfekovaných religovanými genomy WT viru a mutovaného viru	74
5.2.3	Zastoupení minoritních proteinů ve virových částicích je odlišné mezi WT virem a mutovaným virem	76
5.2.4	N' terminální acetylce proteinu VP3 a její vliv na stabilitu strukturních proteinů	78
6	Diskuze	91
7	Závěr	97
8	Seznam použité literatury	99

# 1 Úvod

Viry provázely lidstvo už snad od dob jeho vzniku. Do historie se nesmazatelným písmem uvedly *Varilola*, *Poliovirus*, *Influenza A* a v současné době hlavně koronaviry. Velice významné jsou rostlinné viry, které často mají velký dopad na produkci hospodářsky významných plodin a tím zisky farmářů. Viry ale nemusí být pouhými strašáky a masovými zabijáky lidské populace. Na výzkum bakteriofágů se upínají naděje lidí po celém světě, jsou nadějí v boji s bakteriálními kmeny rezistentními na antibiotika. Některé druhy virů pak mají potenciál stát se další možností v léčbě onkologických onemocnění, dokáží se velice dobře pomnožovat v transformovaných buňkách a ničit je. Jiné jsou použitelné jako transportní částice pro terapeutika nebo systémy jakým je například Crispr Cas9, mají tedy potenciál pro léčbu celé řady chorob.

Mezi takto využitelné viry patří i polyomaviry. Polyomaviry jsou malé neobalené viry, jejichž genomem je dvouvláknová molekula DNA. Částice těchto virů mají ikosahedrální symetrii a nejsou kryty lipidickým obalem. Polyomaviry dokáží způsobit chronickou infekci a nejčastěji při imunodeficienci svého hostitele mu dokáží způsobit nemalé komplikace. Strukturní proteiny polyomavirů zároveň dokáží vytvářet virům podobné částice. Ty je možné používat pro přípravu vakcín a zároveň mají velký potenciál být využity jako výše zmíněné vektory pro dopravu nákladu (terapeutické DNA, léčiv, proteinů) do buněk. Bohužel se stále nedaří připravit částice, které by do buněk dopravovaly náklad stejně efektivně jako viriony virové genomy.

Jednou z možných příčin nízké efektivity uměle připravených částic může být nesprávné zastoupení postranlačních modifikací u strukturních proteinů, ze kterých byly částice připraveny. Jednou takovou postranlační modifikací je i acetylace. Acetylace je jednou z nejběžnějších posttranlačních modifikací v buňkách. Acetylace nehistonových proteinů má nejčastěji dopad na jejich stabilitu, strukturu, aktivitu, interakce s jinými proteiny a buněčnou lokalizaci. Tato práce se zabývá významem acetylace strukturních proteinů na virovou infektivitu.

## 2 Literární přehled

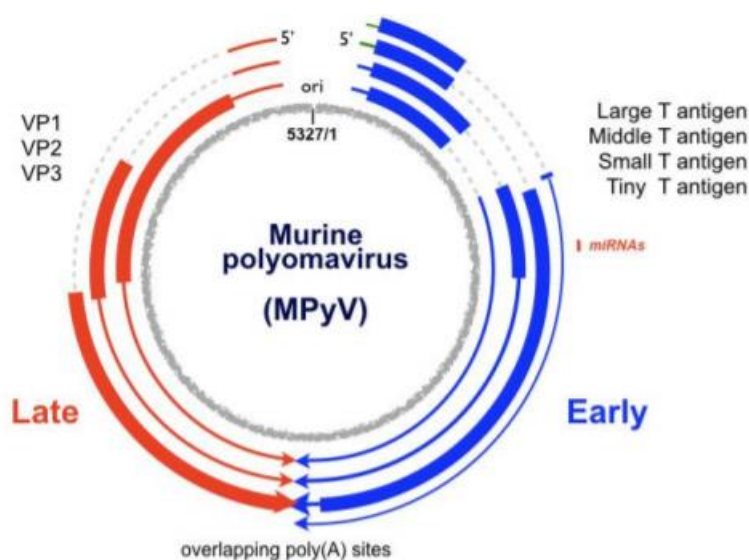
### 2.1 Polyomaviry

Polyomaviry jsou malé neobalené viry s tumorogenním potenciálem a širokým hostitelským spektrem. Infikují obratlovce (savce včetně člověka, ptáky a ryby) a polyomavirové sekvence byly také nalezeny u plazů a členovců (hmyz a pavoukovci) (Buck *et al.*, 2016, Calvignac-Spencer *et al.*, 2016; Ehlers *et al.*, 2019). Kapsida polyomavirů je tvořena 3 strukturními proteiny a genomem je dvouvláknová cirkulární molekula DNA, která je asociována s buněčnými histony (kromě H1). Všechny mají onkogenní potenciál. Čeleď *Polyomaviridae* je tvořena 4 rody: Alfapolyomaviry, Betapolyomaviry, Deltapolyomaviry a Gammapolyomaviry, které dohromady zahrnují 89 virových druhů. Nejvíce zástupců polyomavirů spadá mezi Alfapolyomaviry (42 zástupců), následují je Betapolyomaviry se 34 zástupci a dále Delta a Gammapolyomaviry se 4, respektive 9 zástupci. Z molekulárně biologického hlediska jsou nejvíce prostudovanými zástupci modelové viry – myší polyomavirus (MPyV) patřící mezi Alfapolyomaviry a Simian virus 40 (SV40), který je řazený mezi Betapolyomaviry. Dále jsou intenzivně studovány lidské Betapolyomaviry BK virus (BKV) a JC virus (JCV), a virus Merklůva karcinomu (MCPyV), který je řazen mezi Alfapolyomaviry (převzato z <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> dne 12. 4. 2020).

### 2.2 Organizace genomu myšího polyomaviru

Genom myšího polyomaviru je dlouhý přibližně 5300 bp a může být rozdělen na tři funkční celky (Obrázek 1), nekódující úsek (regulační oblast) a dva kódující úseky – časnou a pozdní oblast. Nekódující oblast obsahuje jediný počátek replikace a promotory a enhancery transkripce. Transkripce běží obousměrně, časné a pozdní transkripty jsou přepisovány z opačných řetězců DNA. Časná oblast genomu kóduje virové regulační proteiny, tumorové neboli T antigeny. MPyV kóduje tři T antigeny – velký (LT), střední (MT) a malý (ST) T antigen. Všechny T antigeny mají společnou N' koncovou sekvenci a odlišnou C' koncovou oblast, mRNA, které je kódují, vznikají alternativním sestřihem ze společné pre - mRNA. Časná oblast genomu je transkribována a exprimována časně po vstupu viru do buňky a exprese pokračuje

i v pozdních stádiích infekce. Pozdní oblast genomu je exprimovaná až po zahájení replikace virového genomu. Pozdní oblast genomu kóduje tři kapsidové proteiny – VP1, VP2 a VP3. Stejně jako u časných mRNA i pozdní mRNA vznikají alternativním sestřihem ze společné pre-mRNA. Alternativním sestřihem vznikají tři typy monocistronních mRNA: 16S mRNA kódující protein VP1, 18S mRNA kódující protein VP3 a 19S mRNA kódující protein VP2. Kódující oblast proteinů VP2 a VP3 se překrývá, celá sekvence proteinu VP3 je obsažena v C' koncové sekvenci proteinu VP2 a oba geny jsou čteny ve stejném čtecím rámci. Oblast kódující N' koncovou část proteinu VP1 se překrývá s C' koncovou sekvencí proteinu VP2 a VP3, ale protein VP1 je translatován z jiného čtecího rámce než proteiny VP2 a VP3.



**Obrázek 1: Genom myšího polyomaviru** lze rozdělit na časnou a pozdní oblast. Ty jsou od sebe odděleny regulační oblastí, která obsahuje replikační počátek (ori), promotory a enhancer. Na obrázku jsou znázorněny pozice genů, ze kterých jsou kódovány jednotlivé virové produkty, počáteční a koncové nukleotidy jednotlivých mRNA a nukleotidové pozice intronů. (převzato z Carmichael, *et al.*, 2016).

## 2.3 Replikační cyklus viru

Vzhledem k malé kódující kapacitě virového genomu musí virus využívat buněčný replikační a transkripční aparát. Pro virus je důležité dopravit svoji genetickou informaci do jádra hostitelské buňky. MPyV se váže na povrchové receptory – gangliosidy GD1a a GT1b (Tsai *et al.*, 2003). Po navázání na receptor je virus endocytován v monopinotickém váčku, endocytóza MPyV není závislá na klatrinu ani kaveolinu - 1 (Liebl *et al.*, 2006). Virus dále putuje přes časné a pozdní endozomy do endoplazmatického retikula (ER). Virová částice se v ER částečně rozvolňuje, což vede k odhalení minoritních proteinů a úniku z ER do cytosolu (shrnutí v Horníková *et al.*, 2020). Z cytosolu je částečně rozvolněný virus transportován za účasti importinů jaderným pórem do jádra (Soldatová *et al.*, 2018). Pro dosažení jádra je důležitý mikrotubulární transport (shrnutí v Horníková *et al.*, 2020). Zároveň virus při svém vstupu aktivuje signální dráhy. Příkladem je PI3K dráha, která hraje roli v endocytóze virových částic, nebo FAK/SARC dráhy. FAK/SARC je důležitá v mikrotubulárním transportu virů (shrnutí v Horníková *et al.*, 2020). V jádře dochází k transkripci (časné oblasti a po zahájení replikace i pozdní oblasti genomu) a replikaci virové DNA hostitelskými polymerázami. Po translaci dostatečného množství strukturních proteinů dochází v jádře k sestavování nových virionů, lyzi infikované buňky a uvolnění virového potomstva.

## 2.4 Role tumorogenních antigenů v replikačním cyklu polyomavirů

Tumorogenní antigeny jsou nepostradatelné pro replikaci virového genomu. Interagují s mnoha buněčnými komponenty a jsou zodpovědné za iniciaci replikace virové DNA a deregulaci buněčného cyklu hostitelské buňky. Navozují S - fázi buněčného cyklu, čímž připraví vhodné podmínky pro replikaci virové DNA a jsou také zodpovědné za rozvoj tumorogeneze. LT antigen se účastní replikace virové DNA. Váže se do počátku replikace virové DNA. Na molekule DNA vytváří dvojitý hexamer, 24 nm dlouhý a 8 - 12 nm široký. Má helikázovou aktivitu a za přítomnosti hořčnatých iontů dokáže rozplétat dvouvláknové molekuly DNA. LT antigen tvoří komplexy s proteiny, které se účastní replikace DNA - váže DNA polymerázu  $\alpha$ . Navíc LT antigen váže pRB a podílí se tak na deregulaci

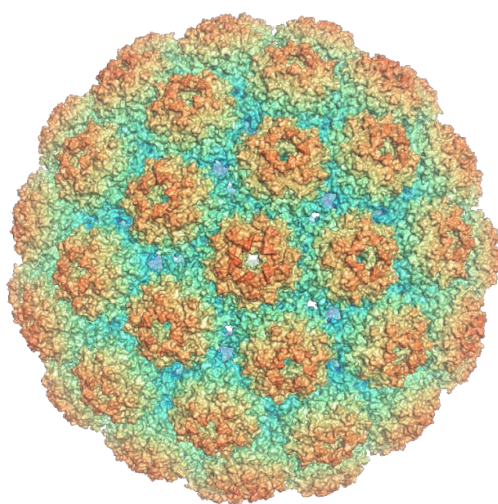
buněčného cyklu (Moses *et al.*, 1994; Wang *et al.* 1991; Valle *et al.*, 2000; Goetz *et al.*, 1988, Borchert *et al.*, 2014 ). Další dva tumorogenní antigeny zasahují do buněčných signalizací, regulací buněčného cyklu a přispívají k nádorové transformaci hostitelské buňky. MT zasahuje ať už přímo nebo díky formování proteinových komplexů do signálních drah spojených s c - Src a ShcA, PI3K, PLC $\gamma$ 1 a PP2A. Velkou roli v těchto interakcích mají C' koncové tyrosiny MT antigenu. (Wang *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2011). Malý tumorogenní antigen rovněž zasahuje do regulace buněčného cyklu. Navíc obsahuje stabilizační doménu, která dokáže stabilizovat LT antigen (Kwun *et al.*, 2013; Mullane *et al.*, 1998).

## 2.5 Virová částice

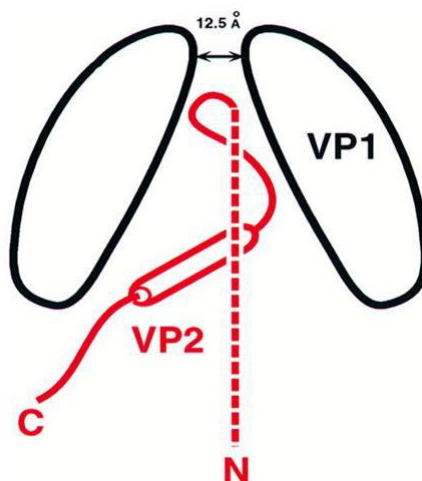
Virová částice (obrázek 2) polyomavirů je složena ze 72 kapsomer. Kapsomera je tvořena 5 molekulami hlavního kapsidového proteinu VP1 a jednou molekulou minoritního kapsidového proteinu VP2 nebo VP3. Pentamer VP1 má přibližně 80 Å v průměru, asi 70 Å na výšku a průměr jeho dutého vnitřního prostoru je asi 50 Å, přičemž se zužuje asi na 12 Å. C' terminální oblast VP1 obsahuje alfa helix (AA 301-312) v takové exponované pozici, že dokáže interagovat pouze se sousedním pentamerem. Zároveň C' koncová oblast vytváří tzv. invazivní rameno (AA 313-361) pro interakce se strukturami utvářenými z pěti nebo šesti VP1 proteinů (Stehle *et al.*, 1996). Z každé kapsomery vybíhají invazivní ramena a vkládají se do sousedních pentamerů, specifita a precizní kontakt je zajištěn aminokyselinovou sekvencí těchto ramen (Hurdiss *et al.*, 2016). Uvnitř proteinové kapsidy se nachází virový minichromozom, který je tvořen kondenzovanou virovou DNA v komplexu s buněčnými histony (H2A, H2B, H3 a H4). Protein VP1 je v kontaktu s virovou DNA, a to prostřednictvím svého N' konce. Na interakci se podílí posledních 15 aminokyselin (Hurdiss *et al.*, 2016). Samotný virion má ikosahedrální symetrii a průměr částice je 45 - 50 nm.

Jakým způsobem se váží minoritní proteiny do pentametu VP1? Tato interakce je rychlá a specifická a odehrává se v cytoplazmě ihned po translaci proteinů. Důležitou roli zde hrají hydrofobní interakce. Do interakce VP2 nebo VP3 s pentametrem VP1 myšího polyomaviru je zapojena C' koncová oblast minoritních proteinů, konkrétně oblast

mezi 140 - 181 (číslováno pro VP3) aminokyselinou na C' konci VP2/VP3. Do axiální kapsy pentameru se C' konec VP2/VP3 vkládá v harpin-like struktuře (obrázek 3). Je pravděpodobné, že C' konec minoritních proteinů neprochází středovou dutinou struktury tvořené pěti VP1 proteiny, ale vytváří se smyčka a konec minoritního proteinu je vystaven do vnitřního prostoru částice (Chen *et al.*, 1998; Barouch *et al.*, 1994; Hurdiss *et al.*, 2016). Vazba minoritních proteinů vede ke změně konformace oblasti BC a DE smyček proteinu (Delos *et al.*, 1995). Při sestavování virových částic v jádře vzniká řada meziproduktů s rozdílným sedimentačním koeficientem. V těchto meziproduktech jsou zastoupeny všechny strukturní proteiny polyomaviru v rozdílných poměrech. Nejprve vzniká meziprodukt 90S (obsahuje také histon H1). Později se objevuje 200S, který je pravděpodobným intermediátem mezi 90S a 240S. Tyto struktury jsou citlivé na faktory jako iontové prostředí izolačního pufru, chelatační agens a neiontové detergenty (Yuen *et al.* 1985).



**Obrázek 2: Virová částice myšího polyomaviru.** Částice je složená ze 72 kapsomer VP1 proteinu, částice je neobalená a v průměru měří 45-50 nm (převzato z Stehle, *et al.*, 1997).



**Obrázek 3: Schematické znázornění interakce proteinu VP1 a minoritních strukturních proteinů.** VP2 protein se váže do vnitřního prostoru VP1 pentameru. C' koncová oblast VP2 proteinu se ohýbá, a nakonec je vystavena do vnitřního prostředí virové částice (převzato z Chen, *et al.*, 1998).

## 2.6 Viru podobné částice

Protein VP1 je schopen sám o sobě vytvářet útvary svou strukturou připomínající virové částice (virus-like particles; VLPs). VP1 protein MPyV exprimovaný v laboratorních kmenech *E. coli* tvoří pouze pentamery, které jsou schopny se *in vitro* uspořádat do VLPs s ikosahedrální symetrií. Tyto viru podobné částice jsou složeny z 72 kapsomer a jsou stabilizovány přítomností vápenatých kationtů. V závislosti na podmínkách reakce (pH, iontová síla, koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ) mohou vznikat i jiné typy částic - ikosahedrální částice o velikosti 32 nebo 24 nm a tubulární struktury s helikálním uspořádáním pentamerů (Salunke *et al.*, 1989). K tvorbě VLPs *in vivo* dochází po heterologní expresi v buňkách kvasinek (Palková *et al.*, 2000a) ale i v hmyzích buňkách (Montros *et al.*, 1991).

Pro sestavování VLPs není potřeba posttranlačních modifikací VP1 proteinu ani minoritních strukturních proteinů, i když VP2 a VP3 proteiny mohou za fyziologických podmínek přispívat k vyšší efektivitě sestavování viru podobných částic (Salunke *et al.*, 1986). Do kapsomer VP1 se dokáží také vázat buněčné proteiny (např. EGFP) fúzovaný s C' koncovou doménou VP3. Takové kapsomery tvoří VLPs,



které dokáží vstoupit do buňky i přesto, že některé tyto VLPs mohou být nedokonale sestavené (Bouřa *et al.*, 2005).

## 2.7 Hlavní strukturní protein VP1

Kapsidový protein VP1 (MW = 45 kDa) je základním stavebním kamenem virové kapsidy. Kromě strukturní funkce má protein VP1 také další funkce v životním cyklu viru. Zprostředkovává přichycení viru na buněčný povrch a tím jeho internalizaci buňkou, může se účastnit kontroly virového růstu a také umožňuje přichycení virového genomu k jaderné matrix, a tak přispívá k zahájení časně transkripce (Garcia *et al.*, 2000). Dále se může podílet na regulaci buněčného cyklu v infikovaných buňkách (Horníková *et al.*, 2017).

Terciální struktura proteinu VP1, struktury pentameru a kapsidy viru byly detailně popsány pomocí krystalografických studií kapsidy viru SV40 (Liddington *et al.*, 1991). Prvních 15 aminokyselin N' koncového ramena je orientováno do dutiny pentameru, kde interaguje s minichromozomem. N' koncové rameno obsahuje jaderný lokalizační signál a DNA vazebnou doménu. Střední část proteinu VP1 je tvořena  $\beta$  listy a  $\alpha$  helixy, které jsou navzájem spojeny šesti smyčkami - BC, DE, HI, EF, FG, a G2. Smyčky BC, DE, HI jsou exponovány na povrchu virionu a jsou pravděpodobně hlavní strukturou zajišťující interakci VP1 s proteiny hostitelských buněk. Smyčka EF je součástí vazebného místa pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Dlouhý flexibilní C' konec se skládá z  $\alpha$  helixů, C' insertu a C' smyčky a účastní se vazby mezi jednotlivými pentamery (Stehle *et al.*, 1996). C' koncové rameno se také účastní tvorby vazebného místa pro kation vápníku (Liddington *et al.*, 1991).

VP1 je na svém N' konci vybaven jaderným lokalizačním signálem (NLS), tato sekvence se nachází v oblasti prvních 5 aminokyselin od N' konce proteinu (Moreland *et al.*, 1991a). Tato sekvence zřejmě není dostatečná k doručení proteinu do jádra. Při samostatné expresi proteinu VP1 v savcích buňkách se VP1 vyskytuje majoritně v cytoplazmě buňky (asi 60 - 70 % proteinu). V jádře se vyskytuje pouze asi 20 % VP1 proteinu (Horníková *et al.*, 2017). Pro transport VP1 pentameru do jádra je potřeba pomoci ze strany minoritních proteinů a důležitý je vznik komplexu pentameru VP1 s jedním z minoritních proteinů (Horníková *et al.*, 2017; Soldatová *et al.*, 2018).

Hlavní strukturní protein viru je schopen nespecificky vázat

DNA virového i buněčného původu bez asistence minoritních strukturních proteinů. Pro vazbu DNA je důležitá jeho N' koncová oblast, konkrétně v rámci prvních 7 aminokyselin. Nespecificky vážou DNA jak pentamery, tak VLPs. *In vivo* jsou VLPs schopny enkapsidovat fragmenty buněčné DNA co do délky ekvivalentní genomové DNA viru. (Moreland *et al.*, 1991b; Gillock *et al.*, 1997). Enkapsidace virové DNA není závislá na specifickém signálu přítomném na MPyV DNA. Její enkapsidace je tak zřejmě závislá hlavně na její velikosti a lokální koncentraci (Španielová *et al.*, 2014).

## 2.8 Vápník a jeho vliv na stabilitu virových částic

Vápenaté ionty jsou důležité pro stabilitu virových částic, zároveň je jejich přítomnost nutná pro sestavení VLPs. Vázat tyto ionty dokáží isoformy A - F myšího polyomaviru (Haynes *et al.*, 1993; Ludlow *et al.*, 1987a; Adamec *et al.*, 2005). Vápenaté ionty jsou součástí virionu a jejich odstranění vede v přítomnosti redukčních činidel (např. dithiotreitolu) k disociaci na kapsomery (Brady *et al.*, 1977). Vazebná doména pro vápenaté ionty se nachází v C' koncové oblasti VP1 proteinu (Ludlow *et al.*, 1987a). Mutace vazebné kapsy pro vápník VP1 proteinu myšího polyomaviru sice nebrání sestavování viru podobných částic, tyto jsou ale nestabilní (Adamec *et al.*, 2005). V jiné studii delece oblasti aminokyselin 262 - 276 (vazebné místo pro vápník) vedla k tomu, že se netvořilo infekční virové potomstvo a VP1 nedokázal vázat vápenaté ionty. Mutace asparaginu 266 způsobila to, že se pentamery VP1 proteinu v přítomnosti chloridu vápenatého nesestavovaly do podoby VLPs. Mutace v této doméně měla vliv na sestavování kapsid (Haynes *et al.*, 1993).

## 2.9 Posttranslační modifikace proteinu VP1

Hlavní strukturní protein MPyV je bohatě posttranslačně modifikován, ale u většiny jeho modifikací není zcela znám jejich význam pro replikační cyklus viru. Doposud bylo popsáno 6 isoform VP1 proteinu myšího polyomaviru s relativní molekulovou hmotností 42 - 45 kDa (Bolen *et al.*, 1981). Jednotlivé isoformy jsou označovány písmeny A - F, liší se posttranslačními modifikacemi a svými izoelektrickými body v rozmezí 5,75 až 6,75 (Tabulka 1). Ve virionech se nejčastěji

vyskytuje isoforma C. Isoformy A, C, E se ale nevyskytují v kapsidách a zřejmě se v případě A i některých C isoform jedná o proteiny lokalizované ve vnitřním prostředí virové částice. Pravděpodobně pouze isoforma A dokáže interagovat s DNA (Bolen *et al.*, 1981).

Konkrétně je protein VP1 modifikován metylací (Burton *et al.*, 1996), acetylací (Bolen *et al.*, 1981), sulfurylací na tyrosinových zbytcích, fosforylací a hydroxylací. Sulfurylace probíhá ve větší míře na kompletních virových částicích než na prázdných kapsidách. VP1 tvořící viriony jsou sulfurylovány 3 x více než prázdné kapsidy. Sulfurylovány jsou pouze dvě isoformy proteinu VP1 ze známých šesti, konkrétně E a F (Ludlow *et al.*, 1987b). Řadu postranlačních modifikací VP1 proteinu rozšiřuje také hydroxylace, která se odehrává na prolinu. Pokud je zabráněno hydroxylaci proteinu VP1, tvoří se menší množství virového potomstva než v případě divokého typu viru. Pro snížení hydroxylace populace VP1 je možné použít L - azetidine - 2 karboxylovou kyselinu (což je analog prolinu). Protein VP1 je přitom hostitelskou buňkou translatován zhruba ve stejném množství jako u divokého typu viru. Ovlivněno je pravděpodobně sbalování proteinu a transport VP1 do jádra buňky (Ludlow *et al.*, 1989).

Virový protein	Hodnota PI proteinu (virová částice)	Hodnota PI proteinu (VLPs)
VP1 A	6,75	6,6
VP1 B	6,5	6,5
VP1 C	6,3	6,3
VP1 E	6,1	6,1
VP1 F	5,9	5,9
VP1 D	5,75	5,75
VP2	5,5	5,5
VP3	7	6,5

**Tabulka 1:** Hodnoty izoelektrických bodů (PI) strukturních proteinů izolovaných z virových částic a VLPs (převzato z Bolen *et al.*, 1981).

Nejlépe prostudovanou modifikací proteinu VP1 je fosforylace. Ve studii byly nalezeny fosforylované zbytky serinů a treoninu 63 v BC smyčce. Na proteinu VP1 byly rozlišeny dva majoritní fosfopeptidy v oblastech AA 58 - 78 a 153 - 173. Jedním z enzymů, které dokáží *in vitro* fosforylovat serinové zbytky 58, 63 a 78, je kasein kináza II. Funkce těchto modifikací není doposud známa, ale fosforylace serinu 66 je důležitá

pro tvorbu virového potomstva (Li *et al.*, 1995b). Fosforylační místa proteinu VP1 myšího polyomaviru v pozici serin 63, treonin 66 a treonin 156 nejsou mezi ostatními polyomaviry konzervovaná (Chen *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že fosforylace nemá vliv na vazbu DNA (Moreland *et al.*, 1991a). Fosfátová skupina je připojena asi na 12 % majoritních strukturních proteinů myšího a asi 13 % VP1 proteinů polyomaviru SV40 (Ponder *et al.*, 1977). Fosforylace VP1 proteinu je důležitá pro sestavování virových částic. U virových mutantů, které mají problém se sestavováním částic, byla zjištěna menší míra fosforylace VP1 proteinu (Garcea *et al.*, 1985). Fosforylace se nevyskytuje pouze u VP1 myšího polyomaviru. Na replikaci a šíření BKV mají pravděpodobně vliv důležitá fosforylační místa VP1 na pozici 80 a VP2 na pozici 254. U mutantů nedochází k expresi VP1 proteinu ani LT antigenu a nedochází k sekundární infekci. Tato residua mohou nejspíš hrát roli ve virové infektivitě a replikaci (Chen *et al.*, 2011).

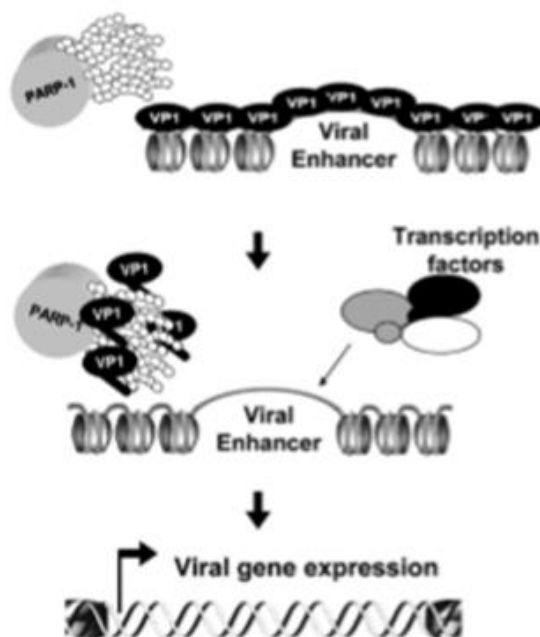
Na míru fosforylace VP1 proteinů má vliv přítomnost minoritních proteinů (Li *et al.*, 1995a) ale také buněčný typ, ve kterém se virus replikuje. Viriony myšího polyomaviru, které se vytvořily v myších ledvinových buňkách (MKC), dokázaly přibližně 10 x lépe aglutinovat erytrocyty (a tím pádem se vázat na receptor) než ty, co vznikly pomnožením v myších embryonálních buňkách (MEC). Viriony, které se sestavovaly v MEC buňkách, byly sice stabilnější, ale přibližně 2 x méně infekční a výrazně méně aglutinovaly erytrocyty. Fosforylace isoform VP1 proteinu byla také variabilní. Virus z MEC buněk měl majoritně fosforylovanou isoformu D, v menší míře pak E a F. Virus produkovaný v buňkách ledvin měl naproti tomu majoritně modifikované isoformy D a E (Ludlow *et al.*, 1987c).

## **2.10 Buněčné proteiny interagující s VP1**

Kromě minoritních strukturních proteinů a buněčného receptoru byly popsány interakce VP1 s některými buněčnými proteiny. VP1 se v pozdní fázi infekce váže na mikrotubuly. Vazba VP1 na mikrotubuly vedla ke zvýšené acetylaci a stabilizaci mikrotubulů (Horníková *et al.*, 2020). VP1 interagoval také s mitotickým vřeténkem, což vedlo k zastavení buněčného cyklu v G2/M (Horníková *et al.*, 2017). Dále byla popsána interakce VP1 s buněčnými chaperony HSP70 a HSP90 (Cripe *et al.* 1995). Oba dva chaperony se podílí na tvorbě makromolekulárních komplexů proteinu

VP1. Chaperon HSP90 se podílí na tvorbě komplexu VP1 - mikrotubuly v buňkách (Horníková *et al.*, 2017). Chaperon HSP70 dokáže efektivně rozvolňovat VLPs i virové částice, v komplexu s VP1 se vyskytuje v době 3 h po infekci (Chromy *et al.* 2003, Chromy *et al.* 2006). Bakteriální chaperon (DnaK) interaguje s C' koncovou doménou VP1, v komplexu s dalšími chaperony (DnaK, DnaJ, a GrpE) dokáže zprostředkovat skládání virům podobných částic (Chromy *et al.*, 2003,). VP1, VP2 i VP3 interagují s Hsp70 a tato interakce nastává rychle po syntéze strukturních proteinů, ale nepřetrvává po sestavení kapsid (Cripe *et al.*, 1995). V jádře interaguje protein VP1 s multifunkčním transkripčním faktorem YY1 (Pálková *et al.*, 2000b). Předpokládá se, že se tento protein podílí na regulaci virové transkripce a replikace a také že by se mohl účastnit morfogeneze virionu (Garcia *et al.*, 2000). Pro import jak proteinu VP1, tak i virionu do jádra hostitelské buňky je nezbytná interakce NLS VP1 proteinu a  $\alpha$  a  $\beta$  importinů. Interakce s importiny  $\beta$  jsou závislé na NLS signálech strukturních proteinů. Pokud jsou tyto jaderné lokalizační signály mutovány, výrazně se snižuje infektivita viru, nedochází k interakci s importinem  $\beta$ . Pro efektivní doručení nákladu do jádra je ovšem dostatečný jeden NLS v komplexu proteinů VP1 s VP2/VP3 (Soldatova *et al.*, 2018; Bird *et al.*, 2008).

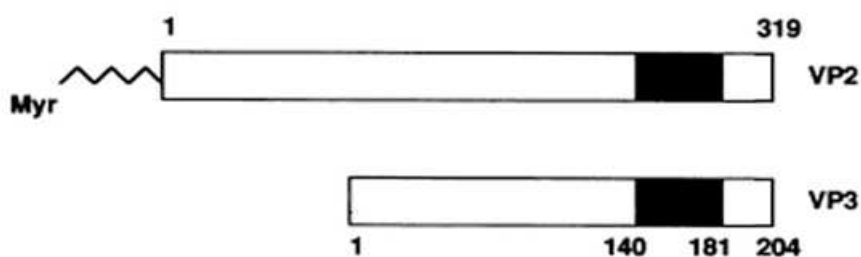
Dalším proteinem, který interaguje s VP1 je Poly (ADP-ribose) polymeráza (PARP). Aktivita PARP v jádře je potřebná pro replikaci viru a vede k úplnému uvolnění VP1 proteinu z virové DNA nejspíše z oblasti enhaceru (obrázek 4). Samotný VP1 pravděpodobně stimuluje aktivitu PARP a tyto děje vedou k iniciaci časně transkripce (Carbone *et al.*, 2006).



**Obrázek 4: Interakce PARP a VP1 myšího polyomaviru v časně fázi virové infekce.** Nekovalentní interakce VP1 s PARP snižuje afinitu VP1 k molekule DNA a dochází k jeho disociaci z promotorové oblasti. Interakce VP1 s PARPem může vést až k úplné disociaci z virové DNA. Po disociaci může dojít k transkripci časných genů (převzato z Carbone *et al.*, 2006).

## 2.11 Minoritní strukturní proteiny polyomavirů

Minoritní proteiny myšího polyomaviru (obrázek 5) se ve virionu vyskytují v monomerní podobě. Sedimentační koeficient VP2 je roven 2,8S a vypočítaná molekulární hmotnost proteinu je 32,9 kDa a 22 kDa proteinu VP3. VP3 protein je kratší variantou VP2 proteinu. VP2 má unikátní N' koncovou sekvenci, zatímco s proteinem VP3 má stejnou C' koncovou oblast (Giorda *et al.*, 2013). Pro funkci minoritních proteinů je důležitý vysoký výskyt  $\alpha$  helixů v jejich sekundární struktuře. Ty jsou zastoupeny 57 % v případě VP2 (spíše na jeho N' konci), respektive 45 % u VP3. Minoritní proteiny vykazují vysokou afinitu k membránovým strukturám a vykazují vlastnosti viroporinů (Huerfano *et al.*, 2010). VP2 je možné pozorovat v cytoplazmě okolo jádra při jeho samostatné expresi v buňkách, ale za stejných podmínek byl VP3 v cytoplazmě difúzní (Forstová *et al.*, 1993, Huerfano *et al.*, 2010). Pro úspěšnou translokaci minoritních proteinů do jádra je nutná interakce s VP1 pentamerem.



**Obrázek 5: Porovnání proteinů VP2 VP3.** Protein VP3 je zkrácenou formou proteinu VP2. VP2 je myristylovaný. Zvýrazněny jsou oblasti důležité k interakci s VP1 pentamerem, které se nachází na C' koncové oblasti proteinů. Čísla jsou označeny první a poslední aminokyseliny proteinů (převzato z Barouch *et al.*, 1994). Na obrázku jsou vyznačeny důležité oblasti VP1 proteinu.

Minoritní strukturní proteiny polyomavirů jsou důležité pro životní cyklus virů. Virové částice se dokáží tvořit i v nepřítomnosti těchto proteinů a jsou schopny vstoupit do hostitelské buňky. Nedokáží ale vstoupit do jádra buňky nejspíše z důvodu ztráty jaderného lokalizačního signálu (Nakanishi *et al.*, 2007). VP3 proteiny viru SV40 jsou důležité pro kooperaci s VP1 při vstupu do jádra infikované buňky. NLS signál VP3 proteinu je důležitý pro interakci s importiny v době, kdy je VP1 navázán na DNA (Nakanishi *et al.*, 2002). VP2 a VP3 myšího polyomaviru má NLS na svém C' konci. Tato lokalizační sekvence na VP2/VP3 proteinu je podobná

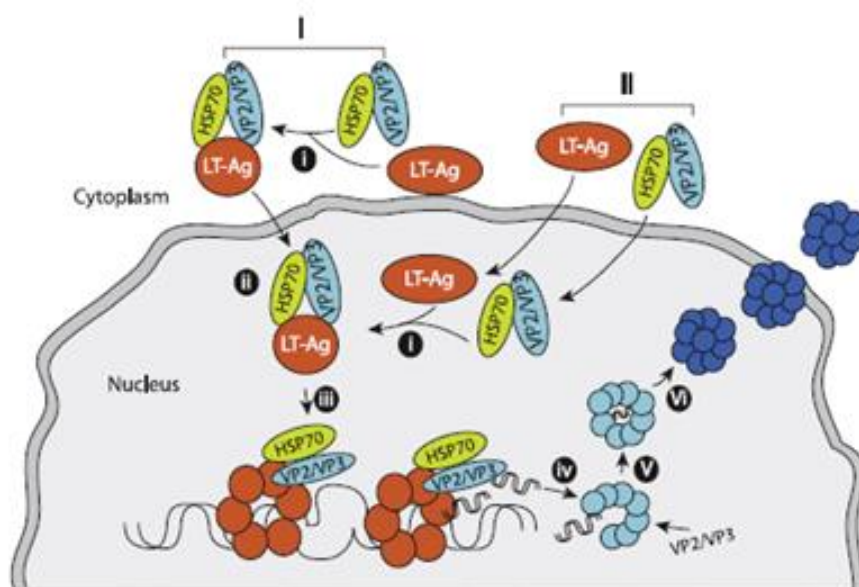
s NLS VP2/VP3 proteinu viru SV40 (Chang *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993). Podobně jako u myšího polyomaviru dokáží minoritní strukturní proteiny SV40 vytvářet póry v membránách. VP3 vytváří póry o průměru 3 - 6 nm. Tyto proteiny tedy slouží jako viroporiny (Giorda *et al.*, 2013). Pro infektivitu MCPV je významný protein VP2, jehož nepřítomnost ve virových částicích vyústí ve výrazně sníženou efektivitu viru, který je navzdory tomu schopen skládat virové částice obsahující DNA a navázat se na povrch buněk. VP3 se naproti tomu pravděpodobně nevyskytuje ve virionech ani v infikovaných buňkách (Schowalter *et al.*, 2013). VP2 a VP3 viru SV40 jsou důležité pro vstup viru a jeho únik z lumen ER. VP2 má na rozdíl od VP3 nízkou afinitu k membránám. Vazba VP2 do pentameru VP1 může vést ke změně konformace a vytvoření vazebné kapsy pro povrchový receptor. Oba dva minoritní proteiny dokáží oligomerizovat (Daniels *et al.*, 2006).

Hydrofóbní domény jsou na všech minoritních strukturních proteinech. VP2 protein viru SV40 má 6 HD domén a na svém unikátním N' konci (aminokyseliny 70 - 100) má dvě HD domény navíc ve srovnání s proteiny VP3 a VP4 (pozdní protein vyskytující se u SV40). Pokud dojde k porušení hydrofobních domén, nemůže dojít ani k perforaci membrán a propagace viru je inhibována. Ve funkci viroporinu jim napomáhají hydrofobní domény. Pro propagaci viru mají velký význam oblasti HD 1, 2, obecně je nejdůležitější HD6 VP2 a VP3 proteinů. HD6 doména se nachází na C' koncové oblasti minoritních proteinů a vkládá se do membrán (například ER) s nejvyšší efektivitou (Giorda *et al.*, 2013). Vazba minoritních proteinů k membránám je negativně regulována vazbou VP2 a VP3 do VP1 pentameru (Daniels *et al.*, 2006). Podobná regulace cytotoxicity minoritních proteinů proteinem VP1 byla pozorována i u myšího polyomaviru (Huerfano *et al.*, 2010).

Role minoritních proteinů v morfogenezi virionu byla popsána u lidského polyomaviru - JC viru. Při skládání JCV virových částic je důležité, aby všechny komponenty dorazily na správné místo, a to do jaderné domény ND10. Aby se tak stalo, je potřeba přítomnosti všech tří strukturních proteinů. Svou úlohu hraje i agnoprotein (nestrukturní protein, vznikající v pozdní fázi infekce), ten usnadňuje vstup do jádra, ale ne dosažení cílové lokality (Shishido - Hara *et al.*, 2004). VP2 JC viru dokáže také vázat DNA a klíčová je pro tuto interakci oblast posledních 13 aminokyselin s lyziny 332 a 336 (Huang *et al.*, 2003). Tyto malé strukturní proteiny JC polyomaviru interagují s virovým LT antigenem a proteinem HSP70 (obrázek 6). Interakce VP2/VP3 s N' terminální oblastí LT zvyšuje jeho vazbu k oblasti počátku replikace,



což vede k silnější replikaci virové DNA. Důvodem může být indukce konformační změny tumorogenního antigenu. VP2/3 proteiny mohou nové kopie virové DNA vázat a navozovat tak proces enkapsidace. Na celém procesu se také podílí HSP70, který minoritní virové proteiny transportuje do jádra buňky (Saribas *et al.*, 2014).



**Obrázek 6: Interakce VP2 s virovou DNA a jeho předpokládaná funkce v enkapsidaci genomové DNA** (převzato z Saribas *et al.*, 2014). VP2/VP3 protein nejprve interaguje s chaperonem HSP70, který jej dopravuje k LT antigenu (buď ještě v cytoplazmě nebo až v jádře buňky). Interakce VP2/VP3 indukuje konformační změnu LT antigenu, což vede k zvýšení vazebné aktivity LT k DNA. S nově syntetizovanou virovou DNA rychle interagují minoritní proteiny a dochází tak k propojení procesu replikace DNA a její enkapsidace. Nakonec dochází k uvolnění virionů z jádra infikované buňky.

## 2.12 Posttranslační modifikace minoritních proteinů

U minoritních proteinů bylo popsáno pouze velmi málo posttranslačních modifikací. VP2 je myristilovaný na svém N' konci. Tato modifikace zřejmě vylepšuje vlastnosti VP2 a nemá výrazný vliv pro replikační cyklus viru. Mutanty, u kterých nemohlo dojít k myristilaci, tvoří virové částice. Zastoupení plných a prázdných částic je přitom srovnatelné s divokým virem. Mutované částice jsou mírně deformovány a náchylné k nízkému pH. Replikace DNA je také srovnatelná s virem bez mutací. Viry s nemyristilovanými VP2 proteiny ale nebyly schopny tak efektivně reinfikovat buňky (pokles asi o 10 - 50 %), pravděpodobně v důsledku špatné interakce s povrchem buněk. Schopnost reinfekce buněk je snížena kvůli komplexům buněčných a virových VP2 proteinů, které bránily správné interakci s povrchem buněk (Krauzewicz *et al.*, 1990;

Mannova *et al.*, 2002a). Minoritní proteiny jsou fosforylované, ale význam není doposud znám (Chen *et al.*, 2011).

### 2.13 Význam acetylace buněčných a virových proteinů

Acetylací podléhá celá řada proteinů, ať už buněčného nebo exogenního původu. Acetylace buněčných proteinů se neodehrává pouze na histonech za cílem rozvolnění chromatinu a regulace genové exprese. Stále více jsou studovány acetylace nehistonových proteinů. Acetylace je hned po fosforylaci nejčastější a nejdůležitější posttranslační modifikace v buňkách a je závislá na chemické látce acetylkoenzymu A (acetylCoA). Rozlišujeme acetylace, které jsou realizovány kotranslačně a podléhají jim rozličné aminokyseliny (N' terminální acetylace) a posttranslačně (acetylace lyzinů) (shrnutí v Drazic *et al.*, 2016). Metabolické dráhy, regulace translace, buněčná odpověď na stres, to jsou příklady procesů regulovaných acetylacemi lyzinů v proteinech. Některé acetylace probíhají nezávisle na enzymatickém aparátu a jedná se o přímou interakci proteinů s acetylkoenzymem A. Tento proces vyžaduje vysoké pH a vysokou koncentraci acetylCoA, odehrává se například v mitochondriích. Lidský genom obsahuje 17 různých genů pro lyzin acetyltransferázy. Tyto enzymy tvoří komplexy složené z různých podjednotek a řadí se do 3 odlišných tříd. Tyto třídy jsou GNAT, MYST a p300/CBP. Objeveno bylo také 5 proteinů, které mají kromě schopnosti přenášet acetylovou skupinu ještě další enzymatické aktivity.

Lyzin deacetylázy KDAC se rozdělují na 4 skupiny. Třídy I, II a IV představují histon deacetylázy závislé na zinečnatých iontech. Většina z těchto enzymů funguje v jádře buňky, ale histon deacetyláza 6 a 10 jsou důležité pro regulaci buněčných procesů v cytoplazmě buňky. Druhou skupinou jsou tzv sirtuiny, ty potřebují  $\text{NAD}^+$  pro svou enzymatickou aktivitu. Tři proteiny ze skupiny sirtuinů (3,4,5) se vyskytují v mitochondriích, zbylé se vyskytují v jádře (1, 6, 7) a v cytoplazmě (2) (shrnutí v Drazic *et al.*, 2016).

Histon deacetyláza 6 (HDAC6) je pravděpodobně nejdůležitější cytoplazmatickou deacetylázou. Je kódována na chromozomu X (Pandey *et al.*, 2007). Promotorová oblast je vybavena CPG ostrovem (o délce asi 1 kbp). Gen obsahuje 28 exonů. Vzniklá výsledná mRNA je dlouhá přibližně 3648 bp (Voelter-Mahlknecht *et al.*, 2003). HDAC6 je cytoplazmatická deacetyláza. Navzdory svému názvu nejsou jejím substrátem

histony, původně byla popsána jako deacetyláza asociovaná s mikrotubuly (Hubbert *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Nicméně množství jejich substrátů roste (viz dále) a v současnosti je považována za hlavní cytoplazmatickou deacetylázu. Lidská HDAC6 obsahuje dvě sekvence pro udržení proteinu v cytoplazmě. Jaderný exportní signál (NES) signál v pozici AA 67 - 76 a signál pro zadržení proteinu v cytoplazmě v pozici AA 1049 - 1058, obě sekvence jsou bohaté na leucinové zbytky. U lidské HDAC6 byly nalezeny jaderné lokalizační signály RK1 a RK2. Signál RK2 je pravděpodobně nefunkční a na aktivitu RK1 mají zřejmě negativní vliv sekvence důležité pro udržení enzymu v cytoplazmě. Myší HDAC6 dokáže aktivně přecházet mezi jádrem a cytoplazmou, kde se vyskytuje v případě diferenciaci nebo arestu buněčného cyklu. V cytoplazmě je detekovatelná u proliferujících buněk. Pro funkci RK1 je důležité residuum R17 a negativně jej regulují aminokyselinové zbytky na pozici 57 - 64. Myší enzym má 3 NES signály, nejsilnější je NES1 (Verdel *et al.*, 2000; Bertos *et al.*, 2004). HDAC6 má 2 deacetylační domény. Pro deacetylázovou aktivitu je potřeba obou domén v určité prostorové orientaci vůči sobě. Změny vzdálenosti mezi doménami mají vliv na deacetylaci tubulinu. Obě domény mají rozdílné funkce, pro interakci se substrátem je pravděpodobně důležitá HD2, HD1 pro deacetylaci (Zhang *et al.*, 2006). Histon deacetyláza 6 může být degradována pomocí kaspáz, konkrétně kaspázou 3. Místo, kde dochází ke štěpení, se nachází mezi doménami BUZ a SE14. Štěpením dochází k odstranění téměř celé oblasti BUZ domény (Husain *et al.*, 2009).

Kromě deacetylace proteinů dokáže HDAC6 vázat tandemové repeticce ubikvitinu. Pro tuto interakci je nezbytná a dostatečná C' koncová oblast enzymu, která obsahuje tzv. BUZ doménu. BUZ doména ale není schopná vázat monomery ubikvitinu a zároveň je tato doména postradatelná pro ubikvitinaci samotné HDAC6 (Hook *et al.*, 2002). Doména BUZ HDAC6 dokáže vázat peptidy, je sekvenčně specifická a je pravděpodobné, že má ohraničenou substrátovou specifitu ve srovnání s jinými BUZ doménami. Vyžaduje Gly - Gly aminokyselinový motiv na C' koncové oblasti peptidu a bazická rezidua v pozici 4/2/3 za tímto motivem (Hard *et al.*, 2010).

SE14 doména HDAC6 se nachází mezi BUZ doménou a katalytickými doménami. SE14 doména má zřejmě atypickou strukturu a enzym díky této doméně při chromatografii migruje jako protein o velikosti přibližně 500 kDa. Tato doména se vyskytuje u lidské, ale nikoliv například u myší HDAC6. SE14 doména není zapojena do procesu vazby ubikvitinovaných proteinů nebo deacetylace. Přítomnost této domény je ale důležitá pro cytoplazmatickou lokalizaci HDAC6. Pokud dochází k mutacím

v této doméně, lidská HDAC6 se svou strukturou se začne podobat myší formě tohoto enzymu. Kromě SE14 domény s cytoplazmatickou retenční aktivitou má lidská HDAC6 další oblasti důležité pro udržení enzymu v cytoplazmě (viz výše) (Bertos *et al.* 2004).

N' terminální acetylace proteinů jsou zprostředkovány enzymatickými komplexy známými jako N' terminální acetyl transferázy (nebo také N'  $\alpha$  acetyl transferázy) (Polevoda *et al.*, 2003, Aksnes *et al.*, 2019). Doposud bylo objeveno 8 tříd enzymatických komplexů označovaných jako NATs. Konkrétně se jedná o NatA, B, C, D, E, F, G, H. (Aksnes *et al.*, 2019). U savců jsou komplexy NatA, B, C tvořeny dvěma podjednotkami. V případě kvasinek mohou s komplexy NatA a NatC interagovat pravděpodobně ještě další podjednotky (Polevoda *et al.*, 2003). NatD, F, G a H jsou tvořeny pouze katalytickou podjednotkou, NatE dokáže interagovat s Naa10 (katalytická podjednotka NatA) a 15 (pomocná podjednotka NatA) NatA komplexu. Nat G se vyskytuje u rostlin (Aksnes *et al.*, 2019).

## 2.14 Regulace aktivity proteinů acetylací

Jednou ze skupin buněčných proteinů regulovaných acetylací jsou transkripční faktory. HNF - 4 (jaderný faktor hepatocytů) je acetylován prostřednictvím CPB (CREB vazebný protein). Takto modifikovány jsou 2 lyzinové zbytky v rámci NLS sekvence. Tato acetylace reguluje buněčnou lokalizaci proteinu a HNF - 4 je zadržován v jádře v důsledku tvorby stabilního komplexu CBP - HNF - 4 nebo kvůli změně konformace NES. Acetylace proteinu HNF - 4 také zvyšuje jeho DNA vazebnou aktivitu a je potřebná pro aktivaci exprese cílových genů (Soutoglou *et al.*, 2000). Podobná situace je také u transkripčního transaktivátoru CIITA (transaktivátor hlavního histokompatibilního komplexu II). PCAF (P300/CBP-asociovaný faktor) acetyluje CIITA na lyzinech 141 a 144 v rámci N' koncového NLS, acetylace jsou i v tomto případě vyžadovány pro aktivitu proteinu a jeho buněčnou lokalizaci. Mohou se ale tvořit stabilní komplexy CIITA a promotorové sekvence nebo některé z jaderných struktur, což zabraňuje transportu z jádra. Na těchto procesech se podílí také CBP (Spilianakis *et al.*, 2000). Acetylace má ale i jiný význam. Protein Cyklin A je po acetylaci na lyzinech 54, 68, 95, 112 ubikvitinilován a degradován

proteazomem. Acetylace tedy zřejmě hraje úlohu nejenom v regulaci stability proteinu, ale také v regulaci buněčného cyklu (Mateo *et al.*, 2010).

## **2.15 Změny v acetylacích proteinů při virové infekci hostitelských buněk**

Během virové infekce dochází k acetylacím virových proteinů, které mají nezhledka vliv na jejich funkce (například RNA polymeráza chřipky). V infikovaných buňkách dochází ke změnám v míře acetylace konkrétních proteinů, a to jak buněčných, tak virových. Nestrukturní proteiny viru Eboly jsou acetylovány hostitelským enzymatickým aparátem. Jedná se o NP protein (nukleoprotein) a protein VP40 (matrixový protein). Acetylace těchto proteinů pravděpodobně ovlivňují jejich interakce s dalšími proteiny. NP byl acetylován v místě vazby RNA a doméně pro vazbu VP35 proteinu (kofaktor polymerázy). VP40 je pravděpodobně také acetylován, a to v jeho bazické části, důležité pro interakce s virovým obalem a nukleokapsidou (Hatakeyama *et al.*, 2018).

Jedním z virů, u kterých je význam acetylace poměrně dobře charakterizován, je virus chřipky A (IAV). V epiteliálních buňkách infikovaných tímto virem dochází k výrazně vyšší acetylaci buněčných mikrotubulů 6 - 12 hodin po infekci tím, že IAV reguluje aktivitu a stabilitu HDAC6. IAV negativně reguluje HDAC6 prostřednictvím regulace aktivity Rho GTPázy (Husain *et al.*, 2009). V buňkách infikovaných virem chřipky A navíc dochází k degradaci enzymu HDAC6 a k odstranění většiny z C' terminální oblasti domény, která váže ubikvitin. Do tohoto procesu je zapojena kaspáza 3 (Husain *et al.*, 2011). Kromě buněčných struktur dochází k acetylacím i virových proteinů, a to konkrétně NP proteinu (lyzin 31 a 90) viru IAV. Acetylace tohoto proteinu jsou důležité pro regulaci aktivity virové RNA dependentní RNA polymerázy. Acetylace enzymem GCN5 na pozici 31 vedla ke zvýšení aktivity RNA polymerázy, opačný efekt na aktivitu enzymu měla acetyl transferáza PCAF a acetylace lyzinu 90. Acetylace residuí 31 a 90 mají zřejmě rozdílný vliv na aktivitu virové polymerázy (Hatakeyama *et al.*, 2018).

HIV (virus lidské imunitní nedostatečnosti) také dokáže manipulovat s enzymatickými aparáty hrajícími roli v acetylacích proteinů. V buňkách neuronů dochází ke snižování míry acetylace mikrotubulů, a naopak se zvyšuje množství enzymu HDAC6. Významnou roli v tomto procesu zřejmě hraje protein GP120, ten se mimo

jiné dokáže na mikrotubuly vázat. V důsledku toho dochází ke snížené asociaci mikrotubulů s motorovými proteiny. Klesá rychlost axonálního transportu, zkracování neuritů a buněčné smrti (Wenzel *et al.*, 2019). Jedním z proteinů viru HIV, který podléhá acetylaci na C' konci, je integráza. Acetylace na pozicích 264, 266 a 273 je zprostředkována acetyltransferázou p300. V důsledku této modifikace je indukována aktivita enzymu (Cereseto *et al.*, 2005). Také Tat protein je regulován acetylací, konkrétně na pozicích lyzinů 28 a 50. Aktivita PCAF vede k acetylaci lyzinu 28 a má pozitivní efekt na potřebnou vazbu Tat ke kináze (CDK - Tefb). Acetylace lyzinu 50 vede k disociaci Tat z TAR sekvence. Enzym, který acetylaci zprostředkovává je p300 (Kiernan *et al.* 1999).

Poněkud odlišným způsobem využívá jeden z enzymů acetylační mašinerie další retrovirus. Tax protein viru HTLV1 (virus lidské T buněčné leukémie) dokáže inhibovat formování stresových granulí, což může vést až k buněčné transformaci. Proces inhibice formování těchto granulí je závislý na enzymu HDAC6 (Legros *et al.*, 2011).

Virová infekce také může v buňkách ovlivnit celkovou míru acetylace proteinů. V buňkách napadených aquareovirem je výrazně zvýšená míra acetylace proteinů. Z 832 proteinů měla většina acetylováno jedno acetylační místo, vyskytovaly se však i takové, které jich měly 7, 9 nebo 14 (KRT18, PDIA3, plectin). Jednalo se o proteiny asociované s membránami, myozinový komplex, histonacetyl transferázy, proteiny s úlohou v homeostáze (HSP90, PDIA3) a proteiny s úlohou v metabolismu, proteosyntéze. Překvapivě, zvýšení hladiny acetylace inhibicí histon deacetyláz mělo negativní dopad na virovou infekci (Guo *et al.*, 2017). Virové proteiny cytomegaloviru (kasidové, tegumentové, a glykoproteiny) jsou acetylovány buněčnými enzymy. Při infekci cytomegalovirem docházelo k výraznému zvýšení acetylace LMNB1 (lamin B). Tato acetylace má protivirový efekt, brání rozrušení jaderné laminy a uvolnění viru. Více acetylovány jsou také mitochondriální proteiny. Acetylace některých mitochondriálních proteinů mají pozitivní vliv na virovou infekci. ATP5B (součást komplexu ATP syntázy) je při virové infekci 4 x více acetylováný. Acetylace integrinu 1  $\beta$  na pozici lyzin 794 (receptor cytomegaloviru) znemožňuje jeho ubikvitinaci (Murray *et al.*, 2018).

Protein p53 je acetylován relativně brzy (2 h) po virové infekci virem vezikulární stomatitidy (VSV) a tato acetylace je důležitá pro transkripci genů asociovaných s p53. Protein p53 s mutací v lyzinu 379 nedokázal negativně regulovat virový titr

a syntézu virových proteinů, ovlivněna byla i imunitní opověď buňky (Muñoz-Fontela *et al.*, 2011).

## **2.16 N' terminální acetylace je evolučně konzervovaná**

Jak u kvasinkových buněk, tak v lidských buňkách můžeme najít kompletně nebo částečně N' terminálně acetylované proteiny. Jejich rozdílné zastoupení se liší podle enzymatického komplexu, který je dokáže acetylovat. V případě NatA substrátů v lidských buňkách je zřejmé, že je většina těchto proteinů úplně nebo téměř úplně acetylována. V případě kvasničných buněk jsou naopak NatA substráty částečně acetylované. NatB substráty kvasinek jsou acetylovány úplně a skoro úplně acetylované jsou v lidských buňkách. Lidské buňky ale obsahují větší množství NatB substrátů oproti kvasinkovým buňkám, zároveň zde mohou existovat další dosud neobjevené komplexy acetylující Met – Lys - koncové aminokyseliny. Celkově je predikováno, že přibližně 77 % proteinů v lidských buňkách je N' terminálně acetylovaných, v kvasinkách je toto číslo asi o 20 % nižší (Arnesen *et al.*, 2009).

## **2.17 N' terminální acetylace ovlivňuje stabilitu proteinů a jejich interakce s buněčnými strukturami**

N' terminální acetylace hrají roli ve stabilitě proteinů a zasahují do N' terminální dráhy. Modifikace acetylovou skupinou na N' konci proteinu vede k vytvoření degronu rozlišovaného ubikvitin ligázou (Doa10). Může se jednat o jeden z mechanismů kontroly kvality vytvořených proteinů. Při správném sbalení, interakci s konkrétní podjednotkou a interakci s chaperonem může dojít k zakrytí degradačního signálu. Acetylovaný degron tak není přístupný pro Doa10 a degradace bude výrazně snížena nebo úplně zastavena. Opačný efekt nastane, pokud bude degradační signál vystaven pro rozlišení ubikvitin ligázou (Hwang *et al.*, 2010).

Příkladem N' terminálně acetylovaného proteinu je  $\alpha$  - synuclein. Acetylace tohoto proteinu na N' konci vede k formování většího množství  $\alpha$  helixů (helicity) této oblasti proteinu a ten následně vykazuje přibližně 2 x vyšší afinitu k negativně nabitým lipidům (oproti neacetylované formě). Vliv této acetylace zasahuje až k 12. aminokyselině od N' konce  $\alpha$  - synucleinu (Maltsev *et al.*, 2012). Navýšení

helicity prvních 10 N' koncových aminokyselin bylo zjištěno také pro acetylovaný  $\alpha$  - synuclein navázaný na SDS micelu. Vazba  $\alpha$  - synucleinu k micelám detergentu BOG zvyšuje helicitu acetylované i neacetylované formy proteinu. Modifikovaná forma s micelami výrazně lépe interaguje, do interakce je zapojeno 30 N' terminálních aminokyselin (Dikiy *et al.*, 2014). Mnohem větší nárůst helicity je pozorovatelný u 15 aminokyselin dlouhých peptidů odvozených od N' konce  $\alpha$  - synucleinu po jeho acetylaci. Největší nárůst se týkal prvních 5 aminokyselin (Maltsev *et al.*, 2012). Konformace tohoto proteinu „broken helix“ je zachována i po jeho acetylaci, ta také omezuje štěpení N' konce  $\alpha$  - synucleinu, acetylace rovněž vede k vyšší afinitě pro synaptické vezikly (Dikiy *et al.*, 2014). Při nízkých koncentracích detergentu se acetylovaný i neacetylovaný  $\alpha$  - synuclein váže k micelám spíše slabě a nespecificky. Při zvýšení koncentrace SDS se zvýšilo také množství proteinu navázaného na micely (Ruzafa *et al.*, 2017). N terminální acetylace  $\alpha$  - synucleinu má pravděpodobně negativní vliv na tvorbu amyloidních agregátů. Terminálně acetylovaná forma výše popsaného proteinu je tvoří pomaleji (Ruzafa *et al.*, 2017; Bu *et al.*, 2017), což je způsobeno redukcí vodíkových vazeb v rámci molekuly  $\alpha$ -synucleinu a zabraňuje jejich formování. Množství těchto slabých interakcí je u acetylovaného  $\alpha$  - synucleinu mnohem nižší, než u neacetylované formy (Bu *et al.*, 2017).

## 2.18 N' terminální acetylace proteinů proteozomálních podjednotek

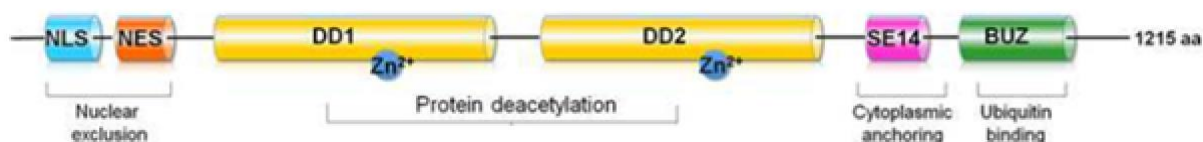
Dalším vysoce acetylovaným proteinovým komplexem je proteazom kvasinek. Kvasinkový 20S proteazom má N' terminálně acetylované podjednotky  $\alpha$  1, 2, 3, 4, 7 a  $\beta$  3 a ty jsou substrátovým cílem pro komplex Nat1. Acetylovány jsou také další 3 podjednotky  $\alpha$  5 a 6, které jsou substrátem pro MAK3. Substrátem Nat3 je podjednotka  $\beta$  4. Ostatní podjednotky beta 1, 2, 5, 6, 7 jsou procesované a po odštěpení iniciátorového metioninu neacetylovány (Kimura *et al.*, 2000). V případě 19S proteazomu kvasinky je celkem 10 podjednotek N' terminálně acetylováno. 8 z jeho podjednotek je acetylováno NatA komplexem. Jejich N' terminální rezidua jsou serin, glycin, alanin a treonin a jedná se o podjednotky Rpt4, Rpt5, Rpt6, Rpn2, Rpn3, Rpn5, Rpn6, a Rpn8. Podjednotky Rpt3 a Rpn11 jsou přirozeně acetylovány díky NatB komplexu a jejich N' konec obsahuje iniciační metionin a glutamovou kyselinu



(GLU). Některé další podjednotky jako Rpn9 a Rpt 2b jsou pravděpodobně nemodifikovány. Rpt2a je myristylovaná a Rpt1 je pravděpodobně modifikovaná jinou skupinou podle predikce (Kimura *et al.*, 2003). Zdá se, že N terminální acetylace proteazomálních podjednotek nemá významný vliv na jeho aktivitu (Kimura *et al.*, 2000).

## 2.19 HDAC6

Jak bylo zmíněno, výše HDAC6 má několik domén (Obrázek 7), které souvisí s její aktivitou. Má dvě domény zajišťující deacetylázovou aktivitu a jednu doménu vázající ubiquitin. Tím pádem se jedná o multifunkční enzym, který se účastní řady buněčných procesů. Jedná se o regulaci imunitních reakcí proti patogenům, regulace proliferace buněk, účastní se regulace buněčného pohybu a regulace metabolismu proteinů.



**Obrázek 7: Jednotlivé domény lidské HDAC6.** Na N' konci proteinu jsou lokalizovány NLS a NES signály, které mají vliv na lokalizaci proteinu v buňce. Následují domény DD1 a DD2, které jsou nezbytné pro rozlišení a deacetylaci substrátu. SE14 má velký podíl na tom, že je HDAC6 cytoplazmatickým enzymem. Doména BUZ pak umožňuje, aby HDAC6 interagovat s ubiquitinem (převzato ze Zheng *et al.*, 2017).

## 2.20 HDAC6 reguluje pohyblivost buněk

Díky své buněčné lokalizaci reguluje HDAC6 acetylaci mikrotubulů. HDAC6 je endogenní deacetylázou tubulinu a deacetyluje lyzin na pozici 40  $\alpha$  tubulinu (Hubbert *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Matsuyama *et al.*, 2002). Deacetylase probíhá *in vivo* a také *in vitro* (Matsuyama *et al.*, 2002). Acetylase probíhá na vnitřním povrchu mikrotubulárních struktur (Soppina *et al.*, 2012). HDAC6 preferuje jako substrát dimery tubulinu, které jsou deacetylovány poměrně rychle (Skultetyova *et al.*, 2017; Matsuyama *et al.*, 2002). Dimery tubulinu byly mnohem více preferovaným substrátem (asi 6000 x) ve srovnání s připravenými krátkými peptidy odvozenými od tubulinu. Deacetylase volných dimerů tubulinu probíhá asi 1500 x efektivněji než v případě mikrotubulů. Roli zřejmě hrají sekundární struktury a residua na bočním a podélném

rozhraní tubulinu, které v mikrotubulární formě nejsou pro HDAC6 přístupné (Skultetyova *et al.*, 2017). Rozrušení aktinových vláken nemá vliv na lokalizaci tohoto enzymu (Zhang *et al.*, 2003). Zajímavým důsledkem nadprodukce HDAC6 je 3,5 x vyšší pohyblivost ve srovnání s kontrolními buňkami. HDAC6 tak ovlivňuje chemotaktický pohyb buněk (Hubbert *et al.*, 2002). Mikrotubuly v deacetylovaném stavu jsou totiž mnohem více náchylné k depolymerizaci (Matsuyama *et al.*, 2002). Pro deacetylaci tubulinu je zřejmě potřeba striktně regulované konformace (Zhang *et al.*, 2006). Tento enzym má pravděpodobně vliv také na pohyblivost buněk závislou na aktinu. HDAC6 váže a deacetyluje kortaktin na více lyzinových zbytcích v jeho repetitivní oblasti a díky tomu může docházet právě k důležité interakci kortaktinu s aktinem (Zhang *et al.*, 2007). Acetylace tubulinu má vliv na jeho stabilitu a acetylované mikrotubuly jsou odolnější vůči mechanickému stresu (Xu *et al.*, 2017; Portran *et al.*, 2017; Eshun *et al.*, 2019).

## **2.21 HDAC6 zasahuje do procesů nakládání se špatně sbalenými proteiny**

HDAC6 je důležitá pro správné sestavení aggresomu. V buňkách deficientních na HDAC6 se netvoří aggresom, ale v cytoplazmě se vytváří mikroagregáty špatně sbalených proteinů. Studovaná deacetyláza je zřejmě důležitá pro interakci špatně sbalených proteinů s transportním aparátem, protože dokáže interagovat jak s polyubikvitovanými proteiny, tak také s motorovými proteiny (Kawaguchi *et al.*, 2003). O velmi podobnou situaci se jedná také u stresových granulí. HDAC6 je opět klíčová pro jejich sestavení. To se pravděpodobně děje díky schopnosti interagovat se špatně složenými proteiny i mikrotubulárními proteinovými motory, díky čemuž by mohlo docházet k jejich transportu ať už do aggresomu, nebo stresových granulí. Vliv může mít také regulace acetylace mikrotubulů. HDAC může navíc přímo ve stresových granulích deacetylovat konkrétní proteiny pro jejich správnou funkci v processingu a degradaci proteinů se špatnou konformací (Kwon *et al.*, 2007). V obou případech plní HDAC6 ochrannou funkci. Pokud se v buňkách nevyskytuje, netvoří se tato cytoplazmatická tělíska a buňky podstupují apoptózu (Kwon *et al.*, 2007; Kawaguchi *et al.*, 2003). Nadprodukce HDAC6 může v některých případech zabraňovat procesu neurodegenerace. Tento efekt je závislý na její enzymatické aktivitě a také může mít pozitivní vliv na degenerace související s mutacemi proteazomu ( $\beta$  podjednotka)

(Pandey *et al.*, 2007).

Zároveň acetylace ovlivňuje i aktivitu chaperonů HSP70 a HSP90. Inhibice deacetyláz inhibitorem FK228 vedla k acetylaci HSP70, což ve výsledku mělo protirakovinný efekt. HDAC6 dokáže tvořit komplex s HSP90 a ovlivňovat jeho acetylační stav. Takto může HDAC6 regulovat funkci chaperonů a ovlivňovat, spolu s regulací tvorby aggresomu, metabolismus proteinů v buňce. (převzato z Cloutier *et al.*, 2013).

## 2.22 HDAC6 ovlivňuje i autofágii

Obdobně jako v případě aggresomu a stresových granulí se HDAC6 podílí na fúzi autofagozomu s lysozomem v procesu autofagie indukované špatně sbalenými proteiny (QCA). HDAC6 je naopak postradatelná pro autofagii indukovanou hladověním buňky. Histon deacetyláza pravděpodobně dokáže ovlivňovat aktinové struktury tím, že „rekrutuje“ faktory jako kortaktin, které dokáží remodelovat aktinovou síť a díky tomu může docházet k efektivnější fúzi autofagozomu s lysozomem. HDAC6 však i v tomto procesu může regulovat mikrotubulární transport (Lee *et al.*, 2010). Proto, aby autofagie probíhala efektivně, je potřeba transportovat substrát i autofagozomální mašinerii do pericentriolární oblasti. A zde se uplatňují mikrotubuly a HDAC6 (Iwata *et al.*, 2005). Při QCA se pravděpodobně uplatňuje BUZ doména HDAC6 společně s retrográdním transportem, ve kterém tato doména zajišťuje určitou specifitu (Iwata *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). Ačkoliv je transport autofagozomu k agregátům na této doméně nezávislý, přesto umožňuje asociaci s proteinovými agregáty v rámci QC autofagie. (Lee *et al.*, 2010). V oligodendrocytech hraje HDAC6 roli při vzniku aggresomu (indukovaného proteazomálním inhibitorem MG132). Její inhibice vede k apoptóze buněk v důsledku proteinových agregátů rozptýlených v cytoplazmě buněk. Navíc při inhibici HDAC6 dochází podle všeho k narušení „toků“ autofagie, zvyšuje se množství autofagozomů, Tyto autofagozomy jsou nahromaděny v cytoplazmě, poruchy těchto mechanismů vedou k patologickým stavům (Leyk *et al.*, 2015).

## 2.23 HDAC6 reguluje procesy vrozené imunity

Tento enzym mimo jiné zasahuje také do regulace proteinů vrozené imunity. Deacetylase lyzinu 909 proteinu RIG-I (gen I inducibilní retinoidní kyselinou) vede k detekci virových RNA, konkrétně je důležitá pro vazbu a rozlišení 50ppp-dsRNA. Při odstranění HDAC6 z buněk dochází jen ke slabé protivirové odpovědi (Choi *et al.*, 2016). HDAC6 se podílí také na aktivaci makrofágů. Aktivované makrofágy vykazují sníženou adhezi vlivem snížené acetylce mikrotubulů a dochází tak k jejich lepšímu šíření organismem. Zároveň má HDAC6 vliv na morfologii těchto buněk, které jsou protáhlé a pozorovatelné jsou jejich vyčnívající (panožkám podobné) struktury. Tuto morfologii není možné pozorovat u buněk s inhibovanou HDAC6 (Yan *et al.*, 2014). Je zajímavé, že inhibice aktivity HDAC6 má dopad na zvyšující se expresi cytokinů jako například IL17. Je také možné, že má inhibice vliv na diferenciaci IL17 produkujících buněk. V tomto případě se jedná o  $\gamma\delta$  T lymfocyty. Při embryonálním vývoji vede inhibice HDAC6 k zvyšování populace těchto buněk v periferních imunitních orgánech (Yan *et al.*, 2017).

## 2.24 HDAC6 má vliv na rozvoj nebo supresi rakovinného onemocnění

HDAC6 se podílí nejenom na regulačních mechanismů protivirové obrany a imunitní odpovědi, ale zároveň hraje roli v rozvoji rakovinných onemocnění. Jedním z příkladů je zapojení tohoto proteinu v rozvoji karcinomu vaječníků s mutací v genu ARID1A. HDAC6 deacetyluje p53 na pozici lyzinu 120, což je důležitá acetylce pro navození apoptózy buňky. Ve zdravých buňkách je tento proces regulován právě produktem genu ARID1A, který dokáže negativně regulovat transkripci HDAC6. Pokud je ale ARID1A mutován a nefunkční, může docházet k nadprodukci histondeacetylázy a deacetylaci zmíněného lyzinu p53, což ovlivňuje směřování buňky k apoptóze (Bitler *et al.*, 2017). Inhibice HDAC6 má pozitivní vliv na expresi krátké RNA miR27b, která působí jako onkosupresor a pravděpodobně hraje roli v MET/PI3K/AKT drahách. Při inhibici HDAC6 dochází k tomu, že negativní regulátor Rel A/p65 je acetylován na pozicích 122 a 123, nemůže se dostat do jádra a vázat se do promotorové oblasti miR27b (Jia *et al.*, 2018).

V případě rakoviny prsu je exprese HDAC6 zvyšována hormonem estradiolem.

Maximální akumulace mRNA i enzymu bylo dosaženo v době 72 h po indukci. V souvislosti s akumulací HDAC6 a její deacetylační aktivitou k tubulinu docházelo ke změnám morfologie a pohyblivosti buněk, které svým protáhlým tvarem připomínají neurální buňky. Pacienti s popsáním typem rakoviny, kteří jsou dlouhodobě léčeni terapeutiky proti derivátům estrogenu, mají větší šanci na přežití. To nemusí platit u pacientů bez nadprodukce HDAC6 (Saji *et al.*, 2005).

V porovnání s normálními keratinocyty z úst (NOKs) je v primárních nádorových buňkách (OSCC) a odvozených liniích nadprodukována mRNA pro enzym HDAC6. Množství proteinu HDAC6 exprimované primárními buňkami (OSCC) se pak liší v závislosti na časných a pozdních fázích vývoje nádoru (Sakuma *et al.*, 2007).

v rakovinných buňkách se HDAC6 podílí také na procesech buněčné proliferace a diferenciaci, a to jak negativně, tak pozitivně. HDAC6 a HDAC5 se vyskytují ve větším množství v buněčných liniích odvozených od melanomu. Pravděpodobně se podílejí na regulaci proliferace, neboť jejich vyřazení způsobuje zastavení buněčného cyklu a buňky podstupují apoptózu (Liu *et al.*, 2016). Opačný efekt, než u jiných typů nádorů, můžeme pozorovat u hepatocelulárního karcinomu. HDAC6 je v tomto případě syntetizována jen málo. Její efekt byl mohl být protinádorový. Pokud je HDAC6 v HCC buňkách nadprodukována, negativně působí na proliferaci (zastavení buněčného cyklu v pozdní G1 fázi) a metastázování buněk. Příčinou toho je pravděpodobně negativní vliv enzymu na produkci  $\beta$  - catenin (indukuje jeho degradaci). Tím dochází k snížení aktivity Wnt/ $\beta$  - catenin signální dráhy (Yin *et al.*, 2018). V případě nenádorových buněk byla zjištěna úloha v regulaci vývoje kostí. V důsledku inhibice HDAC6 v dentálních mezenchymálních kmenových buňkách se tvoří ve větším množství odontogenní markery (OSX, ALP, OCN a OPN). HDAC pravděpodobně negativně reguluje diferenciaci těchto buněk. Na rozdíl od dentálních MCS, v osteoklastech měla inhibice HDAC6 negativní vliv na zrání buněk (Wang *et al.*, 2018).

Nízká aktivita HDAC6 má pozitivní vliv při ischemicko - reperfučním poškození. Acetylované mikrotubuly jsou pravděpodobně důležité k udržení struktury Golgiho aparátu. Fragmentace GA (indukována OGDR t oxygen - glucose deprivation/reperfusion) může být vyvolána právě deacetylací tubulinu. Díky inhibici HDAC6 navíc dochází k zastavení aktivity kaspázy 3 a nedochází k tak rychlému štěpení p115. HDAC6 by se proto mohla podílet na regulaci apoptózy (Zhang *et al.*, 2019).

Jak bylo popsáno výše, HDAC6 je proteinem s celou řadou buněčných funkcí

a tyto funkce se mohou výrazně lišit v závislosti na typu buněk. Stále jsou vytvářeny nové inhibitory proti HDAC6 s cílem využít je například v boji proti rakovinným onemocněním. Stejně jako v řadě jiných případů není situace jednoduchá. Globální vliv inhibice HDAC6 by teoreticky mohl vést například k rozvoji neurodegenerativních chorob. Nebo by kromě snížení pohyblivosti některých metastázujících buněk mohla mít obdobný efekt na imunitní buňky. Možným řešením by mohlo být cílené doručování těchto inhibitorů přímo do nádorů, například při využití VLP nanočástic.

### 3 Cíle práce

Acetylace je posttranslační modifikace, která ovlivňuje jak funkci, tak stabilitu proteinů, a to jak buněčných, tak i virových. Na acetylačním stavu řady buněčných (například tubulin, Hsp90) ale i virových proteinů se podílí HDAC6. HDAC6 hraje roli i v replikačních cyklech virů, jakými jsou HIV, nebo chřipka. Již dříve bylo zjištěno, že VP1 protein myšího polyomaviru je acetylován (Bolen *et al.*, 1981), a proto se první část práce zabývá studiem acetylací VP1 proteinu. Konkrétní cíle této práce tedy byly:

- **Ověřit, zda je protein VP1 acetylován ve virových částicích**
- **Určit, zda na acetylaci proteinu VP1 mají vliv minoritní proteiny**
- **Porovnat míru acetylce proteinu VP1 a infektivitu u virových částic izolovaných z buněk s delecí genu pro HDAC6 s virovými částicemi izolovanými z rodičovské buněčné linie**
- **Určit vliv nadprodukce HDAC6 na infektivitu myšího polyomaviru**

Už dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že virový protein VP3 je acetylován na svém N' konci. Při provedení následných analýz byl asparagin 117 nahrazen valinem. Virus nesoucí takovou mutaci je neinfekční. Výše zmíněná záměna aminokyseliny vede k tomu, že protein není acetylován na svém N' konci. N' koncová acetylce ovlivňuje stabilitu proteinu. Nestabilní protein VP3 by mohl negativně ovlivnit virovou infektivitu, proto bylo cílem diplomové práce:

- **Připravit virové částice mutantního viru A117V a divokého typu viru**
- **Porovnat zastoupení minoritních proteinů ve virových částicích mutovaného viru a divokého typu viru**
- **Porovnat stabilitu mutovaného a divokého typu proteinu VP3**

## **4 Materiály a metody**

### **4.1 Nejčastěji používané roztoky**

Pufr B: Tris - Cl (10 mM, pH 7,4); NaCl (150 mM); CaCl<sub>2</sub> (0,01 mM).

EDTA (0,02%): 10 ml 1% EDTA; 490 ml PBS (1 x, sterilní)

PBS: 140mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Verzen: 0,02% EDTA v PBS.

### **4.2 Antibiotika**

Ampicilin (Biomedika), koncentrace 100 µg/ml

Cyklohexamid (Sigma - Aldrich) koncentrace 300 - 700 µg/ml

Kanamycin sulfát (MP Biomedicals) koncentrace 50 µg/ml

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma - Aldrich)

### **4.3 Bakteriální média**

LB médium (Sigma - Aldrich): pepton 10g/l, kvasničný autolyzát 5g/l, chlorid sodný 10g/l,  
pH ~ 7,5

LB médium s přidáním agarem (Sigma - Aldrich): pepton 10g/l, kvasničný autolyzát 5g/l, chlorid sodný 10g/l, agar 15g/l, pH ~ 7,5

SOC médium pepton 20g/l, kvasničný autolyzát 5g/l, chlorid sodný 10 mM, chlorid draselný 2,5 mM, glukóza 20 mM, síran hořečnatý 10 mM, chlorid hořečnatý 10 mM, pH ~ 7,5

TPN médium: 2% (w/V) pepton (Imuna), 0,5% (w/V) kvasniční autolyzát (Imuna), 0,5% (w/V) NaCl



#### 4.4 Média pro tkáňové kultury

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma - Aldrich)

DMEM se sérem - Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FBS 10% (V/V, Thermo Fisher Scientific)

TNM - HF hmyzí médium (Sigma - Aldrich)

TNM - HF hmyzí médium se sérem - TNM - HF hmyzí médium, FBS 10% (V/V)

#### 4.5 Buněčné linie

Myší buněčná linie 3T6 - stabilní buněčná linie myších fibroblastů, senzitivní a permissivní pro myší polyomavirus (ATCC; CCL - 96)

Myší buněčná linie NIH 3T3 - stabilní buněčná linie myších embryonálních fibroblastů (ATCC; CRL - 1658)

Myší buněčná linie WOP - buněčná linie myších embryonálních fibroblastů 3T3 stabilně produkující velký T antigen myšího polyomaviru (Dailey & Basilico, 1985)

Hmyzí buněčná linie Sf9 - buněčná linie odvozená z ovaríí můry blyškovky *Spodoptera frugiperda* (ATCC; CRL - 1711)

#### 4.6 Bakteriální kmeny

F - mcrA  $\Delta$ (mrr - hsdRMS - mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (araleu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$

*Escherichia coli* TOP10 nesoucí plazmid pMJG

*Escherichia coli* TOP10 nesoucí plazmid pMJG s mutací VP2 A117V (Bílková 2014)

#### 4.7 Virus

Myší polyomavirus kmen BG

Rekombinantní bakulovirus produkující hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní protein VP2 myšího polyomaviru (Řípková, 2002)

Rekombinantní bakulovirus produkující hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní protein VP3 myšího polyomaviru (Richterová, 2002)

#### **4.8 Protilátky**

Rt $\alpha$ LT (Dilworth a Griffin, 1982); krysí monoklonální protilátka proti velkému T antigenu myšího polyomaviru, ředěná 50 x.

Rb $\alpha$ MPyV dVP1 (připravena v naší laboratoři); králičí polyklonální protilátka proti denaturovanému proteinu VP1 myšího polyomaviru, ředěná 500 x

Rb $\alpha$ MPyV VP1 (připravena v naší laboratoři); králičí polyklonální protilátka proti nativnímu proteinu VP1 myšího polyomaviru, ředěná 1000 x

Rb $\alpha$ GFP (Abcam); králičí polyklonální protilátka proti GFP, ředěná 1000 x

M $\alpha$ VP2/3 (Forstova *et al.*, 1993); myší monoklonální protilátka proti společné oblasti proteinu VP2/3 myšího polyomaviru, ředěná 5 x

M $\alpha$ AcK (Cell Signalling Technology); myší monoklonální protilátka proti acetylovanému lyzinu, ředěná 1000 x

Rb $\alpha$ HDAC6 (Cell Signalling Technology); králičí monoklonální protilátka proti histon deacetyláze 6, ředěná 1000 x

Rb $\alpha$  GAPDH (Sigma - Aldrich); králičí polyklonální protilátka proti GAPDH, ředěná 5000 x

#### **4.9 Sekundární protilátky**

G $\alpha$ M - HRP (BioRad Laboratories) = Kozí polyklonální protilátka konjugována s křenovou peroxidázou, rozlišující myší imunoglobuliny, která byla ředěná 1000 x.

G $\alpha$ Rb - HRP (BioRad Laboratories) = Kozí polyklonální protilátka konjugována s křenovou peroxidázou, rozlišující králičí imunoglobuliny, která byla ředěná 1000 x

GαRb - AF Cy3 Kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Cy3 (ředění IF 1:1000, Life Technologies)

GαRt - AF 488 Kozí monoklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ředění IF 1:1000, Life Technologies)

#### **4.10 Primery**

Primery pro sekvenaci HDAC6

F primer TGCTGAGTACGTGGGTCATC

R primer TCTGATGGAAACAACCCAGTAC

Primery pro mutagenezi HDAC6 (pozice 646)

F primer TCCTGGACATCACGCCCAGCAC

R primer GGCCTAATGATGGCCATG

Primery pro mutagenezi HDAC6 (pozice 1831)

F primer CCCAGGACACCACGCAGAGCAGGATG

R primer GGTCGCACCACAGCAGCA

Primery pro mutagenezi VP3 proteinu

F primer: TAGAAATATGGTGTGATACCATG

R primer: TTTACAGTAGGGACCTCTTC

Primery pro absolutní kvantifikaci genomových ekvivalentů

F primer: CTGACAAAGAAAGGCTGCTAGA 3'

R primer: TGTTCCCCAGAGACTGTTCA 3'

#### **4.11 Plazmidové konstrukty**

pMJG - plazmid obsahující celý MPyV genom (Kraucewitz *et al.*, 1990)

pLATE - nesoucí sekvenci pozdní oblasti genomu myšího polyomaviru v prazmidu  
pEF1/myc - His vector a umožňujícího expresi pozdních genů pod kontrolou  
eukaryotického promotoru EF1 (Váňová *et al.*, 2020 )

pEGFP.N1 - HDAC6.DC - plazmid kódující lidskou katalyticky deficientní HDAC6  
fúзованou na C' konci s EGFP (catalytic deficient), Addge plasmid #36189 (Gao *et al.*,  
2010)

#### **4.12 Markery a barviva do gelů**

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific)

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific

GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, ředění 1:20000)

#### **4.13 Markery a barviva do gelů**

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific)

(GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific)

GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, ředění 1:20000)

#### **4.14 Izolace DNA pomocí komerčního kitu Macherey - Nagel**

Bakteriální kultura (100 ml) narostlá přes noc byla centrifugována  
při 6000 g a 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet  
byl resuspendován v 8 ml Resuspendačního pufru s RNázouA. Do buněčné suspenze bylo  
napipetováno 8 ml lyzačního pufru s SDS, směs byla promíchána opatrným překlápěním  
zkumavky a zkumavka byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.  
Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 8 ml Neutralizačního pufru, lyzát tím byl zabarven  
do modra. Směs byla opatrně promíchána otáčením zkumavky, dokud roztok nebyl  
bezbarvý a bez precipitátu. Byla připravena kolona s filtrem, na jehož okraj  
bylo nanášeno 12 ml Ekvalibračního pufru. Následně byl přímo do filtru nanášen vzorek

lyzátu. Po prokapání vzorku byly filtr a kolonka promyty 5 ml Ekvalibračního pufru, po tomto promytí byl filtr odstraněn. Kolonka byla promyta 8 ml Promývacího pufru, po tomto kroku byla izolovaná DNA eluována 5 ml Elučního pufru. K 5 ml eluátu bylo přidáno 3,5 ml izopropanolu a směs byla promíchána na třepačce po dobu 2 min. Směs byla přenesena do 30 ml stříkačky a na ústí stříkačky byl upevněn filtr, směs byla opatrně a pomalu protlačena filtrem. Filtr byl stejným způsobem promyt 2 ml etanolu (70%). Pro vysušení filtru od zbytku etanolu byl filtrem pomocí stříkačky opatrně protlačen odpovídající objem vzduchu (toto bylo alespoň 6 x opakováno). Po vysušení filtru byla provedena eluce DNA, filtr byl upevněn na 1 ml stříkačku, do které bylo následně napipetováno 200 - 800  $\mu$ l Elučního pufru (5 mM, pH 8,5). Eluční pufr byl opatrně a pomalu protlačen filtrem. Izolovaná DNA byla uchována při -20 °C.

#### **4.15 Minipreparace plazmidové DNA kitem GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma - Aldrich)**

Narostlá bakteriální kultura (5 ml) byla centrifugována při 16 000 g po dobu 1 min. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován v 200  $\mu$ l Resuspendačního roztoku obsahujícího RNázu. Následně bylo k buněčné suspenzi přidáno 200  $\mu$ l Lyzačního roztoku a obsah zkumavky byl promíchán jejím otáčením. Obsah zkumavky byl s lyzačním pufrem inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5 min a následně bylo přidáno 350  $\mu$ l Neutralizačního pufru. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán převrácením zkumavky a následně byla suspenze centrifugována při 12 000 g po dobu 10 min. Byla připravena kolonka nanesením 500  $\mu$ l Ekvalibračního roztoku. Supernatant byl přenesen na vazebnou kolonku a zkumavka s kolonkou a vzorkem byla centrifugována při 12 000 g po dobu 1 min. Na kolonku bylo nanесeno 500  $\mu$ l Promývacího roztoku 1 a zkumavka s kolonkou a vzorkem byla centrifugována při stejných podmínkách jako v předchozím kroku. Následně bylo na kolonku nanесeno 750  $\mu$ l Promývacího roztoku 2 a byla provedena stejná centrifugace jako po prvním promytí kolonky. Tato centrifugace byla opakována a DNA byla následně eluována do nové mikrozkušavky. Na kolonku bylo nanесeno 100  $\mu$ l Elučního pufru a zkumavka s kolonkou byla centrifugována při stejných podmínkách jako při promývání kolonky. Izolovaná DNA byla uschována při -20 °C.

#### **4.16 Izolace DNA z virových částic**

Z virové suspenze bylo odebráno 10 - 20  $\mu\text{l}$  a objem byl doplněn do 50  $\mu\text{l}$  pufrém B. K virové suspenzi byl přidán  $\text{MgCl}_2$  (výsledná koncentrace 10 mM) a DNáza I (Roche, výsledná koncentrace 0,4 U/ $\mu\text{l}$ ). S DNázou I byly vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 1 h. Reakce byla zastavena přidáním EDTA do výsledné koncentrace 10 mM a enzym byl inaktivován inkubací suspenze při 75 °C po dobu 5 min. Do zkumavky byl přidán Tris (pH 8, výsledná koncentrace 10 mM) a proteinázy K (Roche, konečná koncentrace 50 mg/ml) a vzorky byly s tímto enzymem inkubovány při 60 °C po dobu 1 h. Ke vzorkům byl přidán DTT (výsledná koncentrace 25 mM) a vzorky byly inkubovány při 60 °C po dobu 30 min.

Následně byla směs přečištěna fenol - chloroformovou extrakcí. Směs byla naředěna 4 objemy  $\text{H}_2\text{O}$ . K naředěnému vzorku byl přidán 1 objem směsi fenol - chloroform - izoamylalkohol (25:24:1), vzorky byly následně protřepány na třepačce po dobu 20 s. Poté byla směs centrifugována při 16 000 g a po dobu 5 min. Po centrifugaci byla odebrána horní vodná fáze a DNA v této fázi byla precipitována přidáním 2,5 násobku objemu 96% (w/V) etanolu a 0,1 násobku 3 M octanu sodného (pH 5) přes noc při -20°C. Srážená DNA byla peletována centrifugací při 16 000 g, 4 °C a po dobu 30 min, pelet byl promyt 70% etanolem a centrifugován při 16 000 g po dobu 10 min. Získaný pelet byl vysušen při laboratorní teplotě po dobu 5 - 10 minut a následně rozpuštěn v 15  $\mu\text{l}$  TE pufru.

#### **4.17 Stanovení koncentrace izolované DNA**

Koncentrace izolované DNA byla měřena přístrojem Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) dle návodu výrobce. Koncentrace DNA a její čistota byla určena pomocí software dodávaného k přístroji.

#### **4.18 Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami**

Do mikrozkušavky byl přenesen vzorek izolované DNA (100  $\mu\text{g}$ ), 30 U restrikční endonukleázy (Thermo Fischer Scientific) a 40  $\mu\text{l}$  reakčního pufru (10 x) (Thermo Fischer

Scientific). Objem reakce byl doplněn H<sub>2</sub>O do 400 µl. Reakční směs byla promíchána a inkubována při 37 °C 16 - 20 h. Výsledek restriční štěpení plazmidové DNA byl ověřen provedením elektroforézy v agarózovém gelu.

#### **4.19 Ligační reakce**

Linearizovaná DNA (70 µg) byla smíchána s 1,4 ml reakčního pufru (10 x koncentrovaný Thermo Fischer Scientific) a 14 U enzymu T4 DNA ligázy (Thermo Fischer Scientific). Objem reakce byl doplněn H<sub>2</sub>O do 14 ml. Reakční směs byla protřepána na třepačce a inkubována při 16 °C přes noc. Ligovaná DNA byla přečištěna a koncentrována srážením etanolem.

#### **4.20 Srážení DNA**

Ligovaná DNA byla srážena přidáním 0,1 násobku objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 2,5 násobku objemu 96% etanolu. Reakční směs byla inkubována při -20 °C přes noc. Po inkubaci byla směs centrifugována při 4000 g a 4 °C, po dobu 2 h. Supernatant byl odstraněn a získaný pelet byl resuspendován v 1 ml 70% etanolu a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Reakční směs byla přenesena do čisté mikrozkušavky. Stěny 50 ml zkumavky byly opláchnuty 300 µl 70% etanolu a tento roztok byl přidán k předchozímu. DNA v 70% etanolu byla centrifugována při 20 000 g a 20 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v pufru TE (100 µl). Získaná DNA byla uskladněna při -20 °C.

#### **4.21 Cílená mutageneze**

Pro provedení cílené mutageneze byl použit kit Q5 Site - Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs). Tento kit využívá vnášení cílených mutací do DNA metodou PCR. Dle instrukcí výrobce byla připravena reakční směs (tabulka 2). Templátová DNA byla amplifikována podle programu (tabulka 3). Po dokončení PCR reakce byl 1 µl PCR reakce smíchán s 5 µl 2 x KLD reakčního pufru, 1 µl KLD enzymatické

směsi a 3  $\mu\text{l}$  vody. Směs byla promíchána a inkubována na ledu po dobu 5 min. Následně byla DNA transformována do bakterií teplotním šokem (kapitola 4.28).

Reagencie	Objem (1 reakce)
F primer (10 $\mu\text{M}$ )	1,25 $\mu\text{l}$
R primer (10 $\mu\text{M}$ )	1,25 $\mu\text{l}$
Phusion master mix (2 x)	12,5 $\mu\text{l}$
Templátová DNA (plazmidová)	1 pg - 10 ng
PCR H <sub>2</sub> O	doplnění objemu reakce do 25 $\mu\text{l}$
Celkový objem reakce	25 $\mu\text{l}$

**Tabulka 2:** Složení reakční směsi pro cílenou mutagenezi.

Název kroku	Teplota	Čas
Prvotní denaturace	98 °C	30 s
25 cyklů	98 °C	10 s
	50 - 72 °C	10-30 s
	72 °C	20 - 30 s/kb
Prodloužení vzniklých PCR produktů	72 °C	2 min
konec reakce	4 °C	-

**Tabulka 3:** Nastavení jednotlivých reakčních cyklů v průběhu PCR reakce.

#### 4.22 PCR v reálném čase

Reakční směs pro stanovení počtu virových genomů obsažených ve vzorcích virových izolátů byla namíchána (podle tabulky 4). Použita byla komerční souprava LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). Kromě vzorků byla připravena kalibrační řada plazmidu pMJG ředěného v rozsahu  $10^{-1}$  až  $10^{-7}$ . Po přípravě a nanesení vzorků do desky byla směs v desce krátce centrifugována a inkubována v PCR cycleru podle nastaveného programu (tabulka 5). Analýza výsledků byla provedena s pomocí programu programu Light Cycler 480 SW.



Název složek směsi	Zásobní koncentrace	Objem
Templátová DNA		0,5 µl
F primer	10 µM	0,3 µl
R primer	10 µM	0,3 µl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	2 x	5 µl
PCR H <sub>2</sub> O		3,9 µl

**Tabulka 4: Složení reakční směsi pro qPCR.**

Název kroku	Teplota	Čas
Preinkubace	95 °C	10 min
Amplifikace (45 x)	95 °C	10 s
	60 °C	20 s
	72 °C	30 s
Křivka tání	95 °C	95 s
Výsledná teplota	65 °C	1 min
Chlazení	4 °C	-

**Tabulka 5: Nastavení jednotlivých reakčních cyklů v průběhu PCR reakce.**

#### 4.23 Sekvenační analýza vzorků

Sekvenace byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA na PŘF UK (BIOCEV, Průmyslová 595, Vestec) podle návodu dodaného touto laboratoří. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Mega X (MEGA Software).

#### 4.24 Horizontální agarózová DNA elektroforéza

Pro separaci DNA byl použit agarózový gel (0,8% nebo 1%). Separace probíhala v 0,5 x TBE pufru. Pro vizualizaci DNA byla do agarózového gelu přidána barva GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium). Vzorek DNA (1 - 10 µl) byl smíchán s 0,2 objemy nanášecí barvy (6 x DNA Gel Loading Dye; Thermo Fisher Scientific) a DNA byla separována při 5 V/cm. Separované fragmenty DNA byly vizualizovány UV světlem v transluminátoru InGenius (Syngene).

0,5 x TBE; 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA - NaOH, pH 8.

#### **4.25 Příprava kompetentních bakterií**

Buňky byly naočkovány do 10 ml TPN média a kultivovány přes noc v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 rpm. Vzorek bakteriální suspenze byl naředěn 50 x a byla změřena optická denzita vzorku při vlnové délce 560 nm. Suspenze byla naředěna tak, aby její optická denzita byla 0,1 v 750 ml TPN média. Bakteriální suspenze byla centrifugována při 4 °C a 4000 g po dobu 12 min. Bakteriální pelet byl následně resuspendován v 600 ml vody vychlazené na 4 °C. Bakteriální suspenze byla opět centrifugována při 4 °C a 4000 g po dobu 12 min. Bakteriální pelet byl následně resuspendován v 300 ml vody vychlazené na 4 °C. Po centrifugaci byl buněčný pelet postupně resuspendován v 24 ml, 12 ml a 1,2 ml 10% glycerolu. Získané buňky byly rozděleny do zkumavek po 50 µl, zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80 °C.

#### **4.26 Kultivace bakterií na pevné médium**

Na kultivační misky s pevným LB médiem byly bakterie nanесeny dvojím způsobem. Po inkubaci v tekutém médiu byly buňky naředěny v tekutém LB médiu (nejčastěji 50 µl bakteriální suspenze a 50 µl LB média), nebo bylo na pevné médium nanесeno 100 µl neředěné bakteriální suspenze. Bakteriální suspenze byla na plotně rozetřena pomocí sterilní bakteriologické stěrky. Druhým případem byl křížový roztěr, pomocí kterého byly selektovány jednotlivé bakteriální kolonie.

#### **4.27 Kultivace bakterií v tekutém médiu**

Do LB média s příslušným selekčním antibiotikem byla zaočkována část bakteriální konzervy (cca 20 µl). Nebo byla sterilním párátkem z kultivační misky s pevným LB médiem seškrábnuta část narostlé monokolonie a přenesena do LB média. Buňky byly inkubovány v orbitálním termostatu při 37 °C, 150 rpm 16 - 20 h.

#### **4.28 Uchovávání bakterií.**

Z bakteriální kultury narostlé přes noc bylo odebráno 300  $\mu$ l bakteriální suspenze a ta byla smísená s 300  $\mu$ l glycerolu tak, aby výsledná koncentrace glycerolu byla 15 - 20 %. Bakteriální konzervy byly skladovány při -80 °C.

#### **4.29 Transformace bakterií elektroporací**

Kompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu, následně byl k buňkám přidán 1  $\mu$ l DNA a směs byla promíchána špičkou pipety a přenesena do elektroporační kyvety. Bakterie byly drženy stále na ledu. Buňky byly vloženy do elektroporátoru a elektroporovány elektrickým pulsem (2,5V, 25 $\mu$ F, 200  $\Omega$ , délka pulsu 4,5 - 5 ms). Po elektroporaci bylo k bakteriím přidáno 950  $\mu$ l SOC média a buňky byly inkubovány v orbitálním rotátoru při 37 °C, 250 rpm po dobu 1 h. Po této inkubaci byly bakterie vysety na pevné médium a inkubovány při 37 °C 16 - 20 h.

#### **4.30 Transformace bakterií teplotním šokem**

Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu. K buňkám bylo přidáno 5  $\mu$ l KDL mixu. Buňky byly opatrně promíchány špičkou pipety a následně inkubovány na ledu po dobu 30 min. Následně byly bakterie transformovány inkubací při 42 °C po dobu 30 s a následně ochlazeny na ledu po dobu 5 min. Po inkubaci na ledu bylo k bakteriím přidáno 950  $\mu$ l SOC média a buňky byly inkubovány na orbitálním rotátoru při 37 °C, 250 rpm po dobu 1 h. Po této inkubaci byly bakterie vysety na pevné médium a inkubovány při 37 °C 16 - 20 h.

#### **4.31 Pasážování savčích buněk linie 3T3, 3T6, WOP.**

Z misky (průměr 10 cm) s konfluentně narostlými buňkami bylo odstraněno kultivační médium. Buňky byly opláchnuty verzénem. Na buňky bylo napipetováno 0,5 ml trypsinu (0,25% trypsin v PBS). Buňky s enzymem byly inkubovány 5 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo do misky s buňkami přidáno 10 ml DMEM média se sérem

a buňky byly v tomto médiu pipetováním proti stěně misky resuspendovány. Buňky byly v poměru (1:8 - 1:15) přeneseny na nové kultivační misky a objem byl doplněn DMEM médiem se sérem do 10 ml. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.32 Pasážování hmyzích buněk linie Sf9**

Konfluentně narostlé buňky byly ze dna misky seškrabány silikonovým škrabátkem a homogenizovány. Buněčná suspenze byla přenesena na novou misku a promíchána s TNF - HF médiem se sérem (2 ml buněčné suspenze do 8 ml kultivačního média). Buňky byly kultivovány v termostatu při 27 °C.

#### **4.33 Transfekce savčích buněk pomocí přístroje Amaxa**

Buněčná suspenze obsahující 4 x 10<sup>6</sup> buněk byla centrifugována 6 minut při 350 g a 22 °C. Buněčný pelet byl resuspendován ve 100 µl roztoku Nucleofector V (Lonza). K takto resuspendovaným buňkám bylo přidáno 6 µg plazmidové DNA. Buňky byly přeneseny do elektroporační kyvety a elektroporovány pomocí přístroje Amaxa Nucleofector (Lonza) nastaveném na programy T - 030 (3T6 buňky) nebo U - 030 (3T3 a WOP buňky). Po elektroporaci byly buňky resuspendovány v 0,5 ml RPMI média (Sigma - Aldrich), přeneseny do mikrozkušavky a inkubovány 15 minut při 37 °C. Po 15 minutové inkubaci byly buňky vysety na kultivační misku (průměr 10 cm) nebo na krycí mikroskopická skla umístěná v 24 jamkové desce (40 - 60 µl). Buňky byly kultivovány v DMEM médiu se sérem v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **4.34 Kultivace buněk na mikroskopických sklech**

Jednotlivá krycí mikroskopická skla byla ve sterilním boxu omyta v etanolu, osušena a opálena nad kahanem. Jednotlivá sterilizovaná skla byla umístěna do jamek 24 jamkové destičky. Po jejich ochladnutí byla skla převrstvena 1 ml DMEM média se sérem. Z misky (průměr 6 cm) s konfluentně narostlými buňkami bylo odstraněno

kultivační médium a buňky byly opláchnuty roztokem versenu. Na misku bylo napipetováno 0,3 ml trypsinu, s enzymem byly buňky inkubovány 5 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo do misky s buňkami přidáno 5 ml média a buňky byly v tomto médiu pipetováním proti stěně misky resuspendovány. Do každé jamky 24 jamkové desky byla napipetována suspenze buněk (50 - 100  $\mu$ l) a vzniklá buněčná suspenze byla promíchána protažením pipetou. Buňky byly kultivovány při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.35 Cyklohexamidová assay**

Buňky ( $2 \times 10^5$  transfekovaných buněk nebo  $10^5$  WOP buněk) byly vysety do jednotlivých jamek 24 jamkové desky a byly inkubovány v kultivačním DMEM médiem se sérem přes noc. Druhý den bylo odstraněno kultivační médium a k buňkám bylo přidáno DMEM se sérem s přidáním cyklohexamidu (Sigma - Aldrich; 300 - 700  $\mu$ g/ml). Buňky byly s cyklohexamidem inkubovány v časovém rozmezí 0 - 24 h. Po inkubaci bylo odstraněno médium, buňky byly lyzovány a množství proteinu v lyzátech bylo analyzováno western blotem.

#### **4.36 Infekce buněk 3T6**

Z misky (průměr 10 cm) obsahující buňky narostlé do 60 - 70 % konfluence bylo odstraněno kultivační médium a buňky byly propláchnuty DMEM médiem. Virová suspenze byla naředěna v 1 ml DMEM a nanesena do misky s buňkami. Virová suspenze byla po misce rovnoměrně rozprostřena kýváním a buňky byly následně inkubovány při 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 1 h. Po dokončení inkubace bylo do misky přidáno 10 ml média DMEM se sérem a buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.37 Infekce hmyzích buněk**

Po nárůstu buněk do 80 - 90% konfluence byly buňky plastovým škrabátkem seškrabány ze dna kultivační misky a v poměru 1:2 přeneseny do TNM-HF hmyzího média. V tomto médiu byly buňky inkubovány při 27 °C po dobu 1 h. Po odstranění kultivačního média byl k buňkám přidán 1 ml infekčního inokula. S infekčním inokulem

byly buňky inkubovány při 27 °C po dobu 1 - 1,5 h. Následně bylo k buňkám přidáno 9 ml kultivačního média se sérem. Buňky byly takto inkubovány při 27 °C po dobu 3 - 4 dnů.

#### **4.38 Infekce buněk nasazených na sklíčka**

Buňky byly nasazeny do 24 jamkové destičky s mikroskopickými skly a byly nasazeny tak, aby v den infekce dosáhly konfluence 50 - 70 %. Z jednotlivých jamek bylo odstraněno médium a buňky byly opláchnuty DMEM médiem. Do každé jamky desky byla napipetována hodně naředěná virová suspenze v 200  $\mu$ l DMEM média. Pro titraci virového inokula byla suspenze ředěna v rozsahu  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$ . Buňky byly s virovou suspenzí kultivovány po dobu 1 h při 37 °C. Po dokončení inkubace bylo do každé jamky kultivační desky přidáno 1 ml DMEM média se sérem. Buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 h pro detekci LT antigenu a přibližně 40 - 42 h pro detekci VP1 proteinu.

#### **4.39 Nepřímá imunofluorescence**

Buňky narostlé na mikroskopických sklech ve 24 jamkové destičce byly opláchnuty 1 ml PBS. Po propláchnutí byly buňky fixovány 0,5 ml paraformaldehydu (3,7 % v PBS) a po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly buňky opláchnuty 1 ml PBS. Následně byl k buňkám přidán Triton X - 100 (Sigma - Aldrich; 0,5% v PBS) a buňky s ním byly inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly 3 x opláchnuty 1 ml PBS a po promytí bylo na buňky nanášeno 0,5 ml blokovacího roztoku (0,25% BSA, 0,25% želatina v PBS) a buňky byly inkubovány po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Po blokaci bylo na skla nanášeno 250  $\mu$ l primární protilátky ředěné v blokovacím roztoku. Buňky byly s primární protilátkou inkubovány 60 minut a následně propláchnuty v PBS po dobu 10 minut. Propláchnutí bylo opakováno 3 x a následně bylo do každé jamky nanášeno 250  $\mu$ l sekundární protilátky ředěné v blokovacím roztoku. Buňky byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě ve tmě a následně propláchnuty stejným způsobem jako po inkubaci s primární protilátkou. Nakonec byla skla opláchnuta v destilované vodě a po uschnutí umístěna do kapky 50% glycerolu s DAPI nanášené na podložní sklo. Buňky byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX71.

#### **4.40 Příprava buněčných lyzátů**

Z misek s kultivovanými buňkami bylo odstraněno médium, bylo přidáno PBS a buňky byly z povrchu misky seškrabány pomocí gumového škrabátka. Seškrabané buňky byly spolu s PBS přeneseny do mikrozkušavky a peletovány centrifugací 5 min při 150 g, 4 °C. K buněčnému peletu bylo přidáno 200 - 500 µl roztoku RIPA pufru (150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris - HCl pH = 7,4; 0,05% NP - 40; 1% sodium deoxycholate; 1% Triton X - 100; 0,1% SDS; koktejl inhibitorů proteáz (Roche). Buňky s lyzačním roztokem byly inkubovány 20 minut na ledu. Následně byly mikrozkušavky se vzorky centrifugovány po dobu 30 minut při 20 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a ten byl uschován při -20 °C pro další analýzy.

#### **4.41 Měření koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí kitu Qubit® Protein Assay Kit a fluorometru Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) dle instrukcí výrobce.

#### **4.42 Negativní barvení**

Na parafilm bylo nanášeno 50 µl vzorku (virové suspenze jednotlivých frakcí), následně 2 x 50 µl H<sub>2</sub>O na propláchnutí vzorku a 2 x 25 µl 2% (w/V) kyseliny fosfowolframové (pH 7). Síťka pro elektronovou mikroskopii byla nejprve inkubována v 50 µl vzorku při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně byla síťka inkubována v H<sub>2</sub>O při laboratorní teplotě po dobu 2 x 35 s. Nakonec byla síťka vložena do každé z dvou kapek kyseliny fosfowolframové a inkubace byla provedena při laboratorní teplotě vždy po dobu 60 s. Po poslední inkubaci v kyselině byly síťky osušeny filtračním papírem a ponechány doschnout při laboratorní teplotě přes noc. Pro vizualizaci vzorků byl použit elektronový mikroskop JEOL JEM - 1011.

#### 4.43 Izolace virových částic

Buňky transfekované virovým genomem nebo infikované virovou suspenzí byly zmrazeny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  poté, co alespoň 90 % buněk vykazovalo cytopatický efekt (5 - 10 dní). Buňky byly lyzovány prudkou změnou teplot. Nejprve byly buňky zmrazeny při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně zahřáty na laboratorní teplotu. Tento postup byl 3 x opakován. Lyzované buňky byly seškrabány z povrchu misky škrabátkem, a i s médiem přeneseny do 50 ml zkumavek. Suspenze byla centrifugována při 4800 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 min. Po této centrifugaci byl supernatant odebrán a uchován při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pelet byl resuspendován v 10 mM Tris - HCl pH 7,4 a homogenizován na ledu. Směs byla převedena do 50 ml zkumavky, byla přidána neuraminidáza (Sigma - Aldrich; výsledná koncentrace 0,01 U/ml) a aprotinin (Sigma - Aldrich; výsledná koncentrace 2  $\mu\text{g/ml}$ ) a suspenze byla za stálého kývání inkubována při pokojové teplotě přes noc. Druhý den byla suspenze centrifugována (4800 g;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 30 min), supernatant byl přidán k předchozímu a pelet byl resuspendován v 10 mM Tris - HCl pH 9. Suspenze byla inkubována 4 h za stálého kývání při pokojové teplotě. Po ukončení inkubace byla suspenze centrifugována (4800 g;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 30 min), supernatant byl přidán k předchozímu a pelet vyhozen. Spojené supernatanty byly přeneseny do ultracentrifugačních zkumavek a supernatanty byly podvrstveny roztokem 10% (w/w) sacharózy v pufru B. Zkumavky s podvrstveným supernatantem byly přeneseny do centrifugačních kyvet a vyváženy. Následně byla provedena ultracentrifugace s rotorem SW32 (Beckman Coulter) 25 000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a po dobu 3 h. Po ultracentrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet byl převrstven pufr B, resuspendován a následně homogenizován v homogenizátoru. Homogenizace byla provedena na ledu. Homogenizovaná suspenze byla přenesena do ultracentrifugační zkumavky. Virová suspenze byla doplněna pufr B do 7,9 g a bylo přidáno 3,79 g CsCl. Požadovaná hustota směsi byla ověřena pomocí refraktometru (refraktometrický index = 1,363 - 1,365). Zbýlý objem centrifugační kyvety byl doplněn parafinovým olejem asi 2 mm pod okraj a zkumavky byly vyváženy. Vzorky byly centrifugovány v rotoru SW41 (Beckman Coulter) při 35000 rpm a  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a po dobu 20 - 24 h. Po ukončení centrifugace byly jednotlivé gradienty rozděleny na frakce o objemu přibližně 0,5 ml pomocí zařízení pro odebírání frakcí (Beckman Coulter). Pro každou frakci byl změřen refraktometrický index a na základě těchto hodnot byly



frakce obsahující viriony (refraktometrický index 1,365 - 1,366) nebo prázdné částice (refraktometrický index 1,362 - 1,363) spojeny do tří frakcí. Spojené frakce byly dialyzovány v pufru B při 4 °C přes noc. Následně byly částice ve spojených frakcích koncentrovány centrifugací. Obsah dialyzační membrány byl přenesen do ultracentrifugační zkumavky a podvrstven 10 % roztokem sacharózy v pufru B. Vzorky byly centrifugovány v rotoru SW41 (Beckman Coulter) při 35000 rpm a 4 °C a po dobu 3 h. Supernatant byl odstraněn a následně byl pelet resuspendován v pufru B a homogenizován. Homogenizace byla provedena na ledu. Virová suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek po 50 - 100 µl a ty byly uskladněny při -80 °C.

#### **4.44 Izolace virům podobných částic**

Infikované hmyzí buňky byly 3 - 4 dny po infekci seškrabány pomocí silikonového škrabátka do kultivačního média. Buněčná suspenze byla přenesena do 50 ml zkumavky. Buňky byly centrifugovány při 500 g, 4 °C po dobu 5 min. Pelet hmyzích buněk byl resuspendován v 10 ml pufru B. Resuspendované buňky byly lyzovány sonikací 3 x po dobu 30 s na ledu (Soniprep 150; Schoeller Pharmacia). Buněčný lyzát byl centrifugován při 12 000 g a 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán a použit pro izolaci VLPs částic.

Supernatant byl přenesen do ultracentrifugačních zkumavek a následně byl opatrně podvrstven roztokem 10 % sacharózy (w/V) v pufru B. Ultracentrifugační kyvety byly vyváženy a následně centrifugovány v rotoru SW41 (Beckman Coulter) při 35000 rpm a 4 °C, po dobu 3 h. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, pelet byl resuspendován, a následně homogenizován v pufru B. Homogenizace byla provedena na ledu. Homogenizovaná suspenze byla přenesena do ultracentrifugační zkumavky. Virová suspenze byla doplněna pufrem B do 7,9 g a bylo přidáno 3,79 g CsCl. Požadovaná hustota směsi byla ověřena pomocí refraktometru (refraktometrický index = 1,363 - 1,365). Zbýlý objem centrifugační kyvety byl doplněn parafinovým olejem asi 2 mm pod okraj a zkumavky byly vyváženy. Vzorky byly centrifugovány v rotoru SW41 (Beckman Coulter) při 35000 rpm, 18 °C a po dobu 20 - 24 h. Po dokončení centrifugace byly ultracentrifugační zkumavky přeneseny do držáku a jasný opaleskující proužek tvořený

částicemi byl odebrán injekční stříkačkou s jehlou. Následně byly tyto frakce dialyzovány v pufru B při 4 °C přes noc. Po dialýze byl obsah dialyzační membrány přenesen do ultracentrifugační zkumavky a podvrstven 10 % roztokem sacharózy v pufru B. Vzorky byly centrifugovány v rotoru SW41 (Beckman Coulter) při 35000 rpm a 4 °C, po dobu 3 h. Supernatant byl odstraněn, následně byl pelet resuspendován v pufru B a homogenizován. Homogenizace byla provedena na ledu. Virová suspenze byla rozdělena do mikrozkuvek po 50 - 100 µl a ty byly uskladněny při -80 °C.

#### **4.45 Imunoprecipitace virových a virům podobných částic**

Pro imunoprecipitaci byly využity magnetické kuličky Dynabeads® Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific). Magnetické kuličky byly nejprve resuspendovány opatrným protřepáním na třepačce. Pro jednu reakci bylo použito 20 µl magnetických kuliček. Mikrozkuvky s magnetickými kuličkami byly umístěny na magnet a supernatant byl odebrán. Magnetické kuličky byly propláchnuty roztokem PBS s 0,02% TWEEN 20. Kuličky byly v tomto roztoku resuspendovány a následně opět umístěny na magnet, PBS bylo odebráno. K magnetickým kuličkám byla přidána protilátka ředěná v PBS s 0,02% TWEEN 20, pro jednu reakci bylo použito 5 µg protilátky v 200 µl PBS. Kuličky byly s protilátkou inkubovány na rotátoru při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Následně byly mikrozkuvky s kuličkami umístěny na magnet a supernatant byl odstraněn. Kuličky byly jednou propláchnuty roztokem PBS s 0,02% TWEEN 20. Ke kuličkám byl přidán vzorek virové suspenze (minimální objem 200 µl) a směs byla inkubována na rotátoru při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Mikrozkuvky s kuličkami byly umístěny na magnet a supernatant byl odstraněn. Magnetické kuličky byly 3 x propláchnuty roztokem PBS a následně uchovány při -20 °C.

#### **4.46 SDS elektroforéza a Western blot**

Buněčný lyzát byl v mikrozkuvce smíchán v poměru 4:1 s 5 x SDS nanášecím puforem (5% SDS (w/V)); 50 mM Tris - HCl pH 6,8; 25 % β-merkaptoethanol (w/V), 50 % glycerol (w/V) a 0,005 % bromfenolová modř (w/V). Takto připravená směs

byla povařena v termobloku po dobu 5 minut. Po povaření byly vzorky krátce centrifugovány a 10 - 20  $\mu$ l bylo nanесeno na SDS elektroforézu.

Gely pro separaci proteinů byly připraveny následovně. V 50 ml zkumavce byly smíchány jednotlivé složky separačního gelu (tabulka 6) a roztok byl nalit mezi skla umístěná v aparatuře. Roztok byl převrstven izobutanolem nebo H<sub>2</sub>O. Po polymeraci gelu (30 min) byl pomocí filtračního papíru odstraněn izobutanol a zbytky nezpolymerizovaného akrylamidu. Ve zkumavce byla namíchána směs pro zaostřovací gel (tabulka 7). Směs pro zaostřovací gel byla napipetována až po okraj elektroforetických skel, následně byl mezi skla vložen hřeben a gel byl ponechán polymerovat 30 minut. Po polymeraci byly připravené gely přeneseny do elektroforetické aparatury a byly převrstveny elektroforetickým pufrem (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS (w/V)). Do jednotlivých jamek byly nanесeny vzorky. Proteiny byly separovány 30 min při konstantním napětí 80 V a dále při konstantním napětí 140 V, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru nedomigrovala asi 1 cm od spodního okraje dělicího gelu.

Složky polyakrylamidového gelu	Objem
Akryl amid (30%)	4 ml
Tris - HCl (1M; pH 8,8)	4,5 ml
SDS (10%)	0,12 ml
Destilovaná H <sub>2</sub> O	3,25 ml
APS (10%)	90 $\mu$ l
TEMED	8,5 $\mu$ l
Celkový objem	12 ml

**Tabulka 6: Příprava 10% separačního gelu.**

Složky polyakrylamidového gelu	Objem
Akryl amid (30%)	1 ml
Tris - HCl (1M; pH 8,8)	0,75 ml
SDS (10%)	60 µl
Destilovaná H <sub>2</sub> O	4,2 ml
APS (10%)	40 µl
TEMED	10 µl
Celkový objem	6 ml

**Tabulka 7: Příprava 5% zaostřovacího gelu.**

Aparatura a elektroforetická skla byly po ukončení separace rozebrány. Z gelů byly odstraněny části sloužící jako zaostřovací a byl sestaven blotovací sandwich ze 4 filtračních papírů, 2 filtračních papírů Whatman, gelu, nitrocelulózové membrány, 2 filtračních papírů Whatman a 4 filtračních papírů. Po každé vrstvě papíru nebo po přiložení membrány byly odstraňovány případné bubliny vzduchu, které by mohly bránit přenosu. Takto připravený sandwich byl přenesen do blotovací aparatury, převrstven blotovacím pufrům (25 mM Tris, 195 mM glycin, 20% metanol). Přenos proteinů na membránu probíhal po dobu 1,5 - 3 h v závislosti na typu vzorků při konstantním proudu 250 mA. Po dokončení transferu proteinů byly jednotlivé proteiny detekovány imunologickým značením.

#### **4.47 Dot blot**

Z jednotlivých proteinových vzorků byly odebrány 2 µl a ty byly nakapány na nitrocelulózovou membránu. Po zaschnutí vzorků byla provedena imunodetekce proteinů na membráně.

#### **4.48 Imunologické značení proteinů na membráně**

Nitrocelulózová membrána s nanesenými proteiny byla inkubována po dobu 30 minut v roztoku 5% (w/V) odtučněného mléka v PBS a následně byla inkubována v roztoku primární protilátky naředěné v 5% (w/V) odtučněného mléka v PBS po dobu 60 - 90 minut při pokojové teplotě nebo alternativně přes noc při 4 °C. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána propláchnuta v roztoku PBS 3 x 10 minut

(alternativně 6 x 5 minut). Po promytí membrány byla membrána inkubována se sekundární protilátkou naředěnou v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS při laboratorní teplotě a po dobu 30 minut. Po inkubaci se sekundární protilátkou byly membrány promyty 3 x 10 minut v roztoku PBS. Membrány byly vyvolány komerční soupravou SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) a signál byl detekován přístrojem Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Densita jednotlivých pruhů byla změřena softwarem, který je součástí přístroje.

#### **4.49 Zhášení membrány**

Pro vyvolání více proteinů na jedné membráně byla membrána inkubována v 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  při 37 °C po dobu 15min. Dále byla membrána inkubována 15 min v destilované  $\text{H}_2\text{O}$  a 15 min v PBS. Nakonec byla membrána blokována v roztoku 5% (W/V) odtučněného mléka v PBS a byla provedena imunodetekce protilátkami, jak bylo popsáno výše.

#### **4.50 SDS elektroforéza v gradientovém gelu**

Vzorky pro nanesení na elektroforézu byly připraveny smíšením magnetických kuliček (po imunoprecipitaci) s 2,5  $\mu\text{l}$  4 x Nanášecího pufru (Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu\text{l}$  10 x Redukčního pufru (Thermo Fisher Scientific) a 6,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Vzorky byly denaturovány při 70 °C po dobu 10 min. Gradientový gel (Thermo Fischer Scientific) byl vyjmut z obalu, v dolní části byla stržena páska a v horní části byl opatrně vyjmut hřeben. Gradientový gel byl umístěn do sestavené aparatury. Do prostoru mezi „skla“ byl nalit Elektroforetický pufr NuPAGE MOPS SDS Elektroforetický pufr s antioxidantem (Thermo Fisher Scientific), do vnějšího prostoru aparatury byl nalit NuPAGE MOPS SDS Elektroforetický pufr (Thermo Fisher Scientific). Do jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky (10 - 20  $\mu\text{l}$ ) a marker (4  $\mu\text{l}$ ), vzorky byly separovány při konstantním napětí 200 V. Vzorky proteinů byly separovány po dobu 50 min - 1 h. Následně byl proveden western blot (viz výše) v Blotovacím pufru (25mM bicin, 25 mM Bis - Tris, 1 mM EDTA, 10% metanol).

## 5 Výsledky

### 5.1 Studium acetylace proteinu VP1

#### 5.1.1 VP1 protein je acetylován ve virové částici

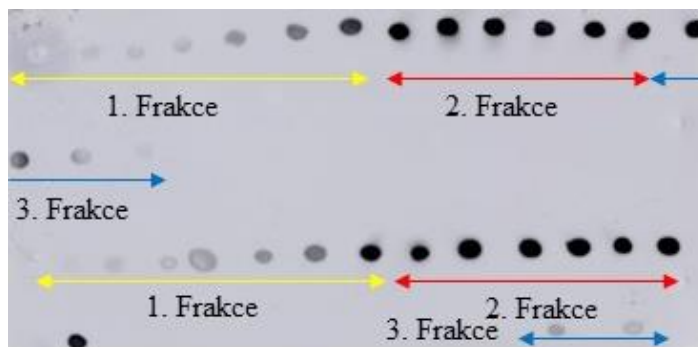
Acetylace proteinu VP1 byla popsána již dříve metodou využívající radioaktivní značení a 2D elektroforézu (Bolen *et al.*, 1981). Naším cílem bylo zjistit, zda je tato modifikace proteinu VP1 detekovatelná komerčně dostupnou protilátkou proti acetylovanému lyzinu a jestli se tento acetylovaný protein nachází ve virové částici myšího polyomaviru.

Izolace viru byla zahájena poté, co přibližně 80 % infikovaných buněk vykazovalo cytopatický efekt. Virus byl izolován ultracentrifugací přes polštář 10% sacharózy. Část (cca 20 %) tohoto hrubého virového izolátu byla uschována pro následnou analýzu a zbytek následně přečištěn v gradientu CsCl. Gradient CsCl byl rozebrán na vzorky o objemu přibližně 500 µl. U těchto vzorků byly změřeny refraktometrické indexy (tabulka 8) a přítomnost proteinu VP1 byla testována metodou dot blot (obrázek 8). Na základě těchto hodnot refraktometrických indexů a přítomnosti proteinu VP1 byly vzorky spojeny do 3 frakcí. První frakce (označená žlutě) obsahuje pouze malé množství virových částic. Vzorky druhé frakce (označená červeně) mají refraktometrické indexy v rozpětí 1,366 - 1,363 a obsahovala převážně virové částice. Vzorky třetí frakce (označená modře) obsahují převážně „prázdné“ virové kapsidy neobsahující DNA. Spojené frakce byly dialyzovány proti pufru B a koncentrovány centrifugací přes sacharózový polštář.

Izolace viru po infekci	
WT virus	
1,375	1,379
1,376	1,376
1,3735	1,37
1,371	1,371
1,365	1,369
1,365	1,368
1,365	1,367
1,366	1,366
1,3655	1,366
1,365	1,366
1,3645	1,364
1,364	1,364
1,363	1,363
1,3626	1,361
1,3625	1,36
1,362	
1,362	

**Tabulka 8 Refraktometrické indexy frakcí viru:**

Refraktometrické indexy byly změřeny u vzorků virové suspenze odebrané po centrifugaci v gradientu CsCl. Žlutě jsou označeny vzorky tvořící 1. frakci. Červeně jsou označeny vzorky tzv. střední frakce, které byly použity pro následující experimenty. Vzorky této frakce obsahovaly infekční virové částice a jejich refraktometrické indexy se nacházely v rozsahu 1,366 - 1,363. Modře jsou označeny vzorky spadající do tzv. lehké frakce, která obsahovala hlavně prázdné virové kapsidy a jejich refraktometrické indexy se nacházely mezi 1,365 a 1,360.

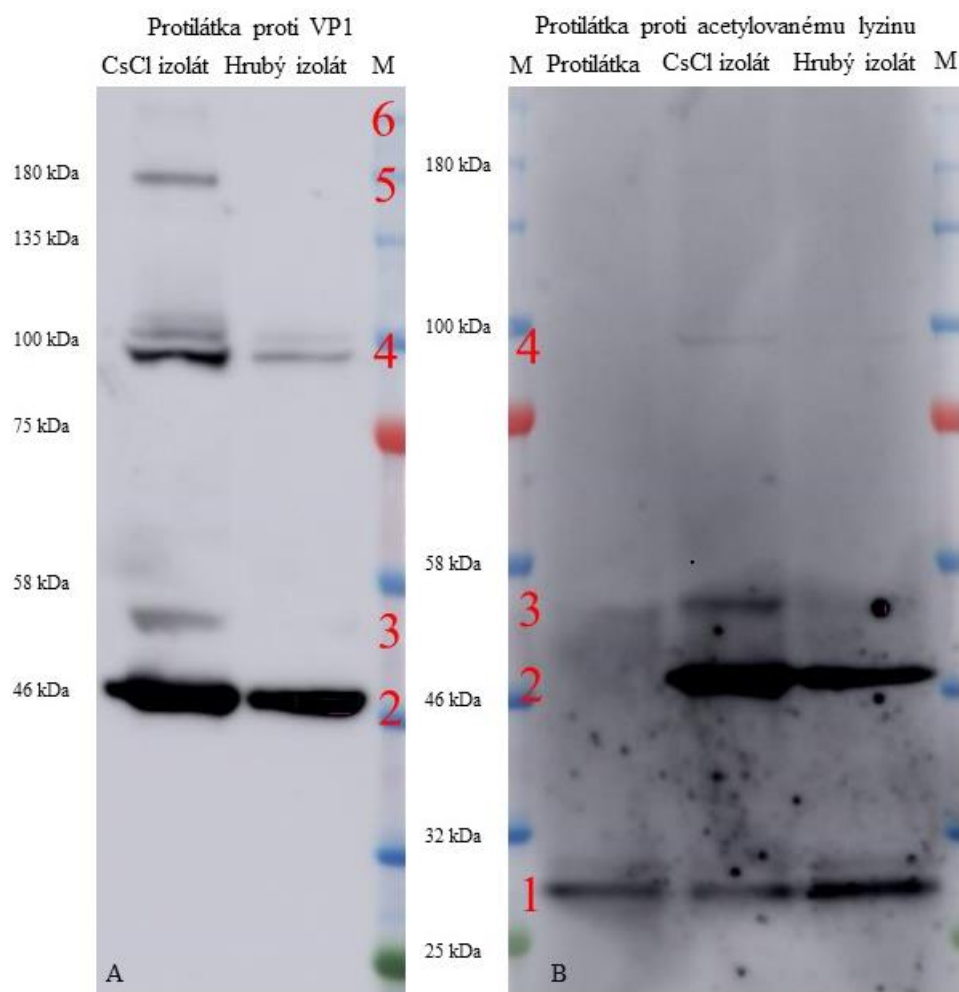


**Obrázek 8 Detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích metodou dot blot.** Virové částice byly izolovány ultracentrifugací přes polštář 10% sacharózy a v gradientu CsCl. V jednotlivých vzorcích odebraných z CsCl gradientu byl detekován VP1 protein. Pro detekci byla použita protilátka specificky rozpoznávající protein VP1. Hlavní majoritní protein byl obsažen ve všech frakcích. Nejvyšší množství VP1 proteinu bylo detekováno ve druhé frakci.

Přítomnost acetylovaného proteinu VP1 byla testována jak v hrubém virovém izolátu, tak i u viru izolovaného CsCl gradientem. Pro zvýšení specifity detekce a k dalšímu zakoncentrování proteinu VP1 byla provedena imunoprecipitace proteinu VP1, vzorky byly separovány na gradientovém polyakrylamidového gelu a následně byly separované proteiny přeneseny na membránu. Specifickými protilátkami byl detekován protein VP1 myšího polyomaviru (obrázek 9 část A) a jeho acetylovaná forma (protilátkou specificky rozeznávající acetylovaný lyzin, obrázek 9 část B). VP1 protein byl detekován ve své monomerní podobě (přibližně 46 kDa; obrázek 9 - pruh 2), ale i ve proužcích o nižší mobilitě, představující pravděpodobně posttranslačně modifikované formy. Jedná se hlavně o proužek o relativní molekulové hmotnosti přibližně 52 kDa (obrázek 9 - pruh 3), pozorovaný u vzorku připraveného z virových částic izolovaných v gradientu CsCl. Ve stejném vzorku jsme také pozorovali VP1 ve formě dimeru (přibližně 100 kDa; obrázek 9 - pruh 4) a také větších agregátů (asi 180 kDa; obrázek 9 - pruh 5 a 6). V hrubém izolátu viru jsme naproti tomu pozorovali přítomnost pouze dvou výše uvedených forem VP1 proteinu. Jednalo se o monomerní VP1 a VP1 ve formě dimeru.

Acetylovaný lyzin byl detekován u viru izolovaného CsCl gradientem v pruzích dvou velikostí odpovídajících pruhům proteinu VP1. Pruh o relativní molekulové hmotnost 46 kDa (obrázek č. 9; pruh 2) odpovídající monomernímu proteinu VP1. V případě vzorku proteinů virových částic izolovaných centrifugací přes CsCl gradient byl detekován také proužek v oblasti přibližně 52 kDa, který pravděpodobně představuje hyperacetylovanou formu proteinu VP1 (obrázek č. 9; pruh 3). V případě vzorku proteinů virových částic izolovaných přes 10 % roztok sacharózy, jsme detekovali proužek acetylovaného monomerního proteinu VP1 (přibližně 46 kDa) a velmi slabý proužek hyperacetylované formy (přibližně 52 kDa). U obou vzorků byly detekovány velmi slabé proužky pravděpodobně pouze mírně acetylované dimerní formy VP1 proteinu. Také jsme protilátkou proti acetylovanému lyzinu detekovali pruh o velikosti přibližně 30 kDa (obrázek 9; pruh 1). Tento pruh se vyskytoval ve všech vzorcích, včetně vzorku obsahujícího pouze protilátku proti VP1. Pravděpodobně se tedy jedná o lehký řetězec této protilátky. Tato data naznačují, že protein VP1 je ve virové částici acetylovaný. Ve virionu se vyskytuje více jak jedna acetylovaná forma proteinu VP1.





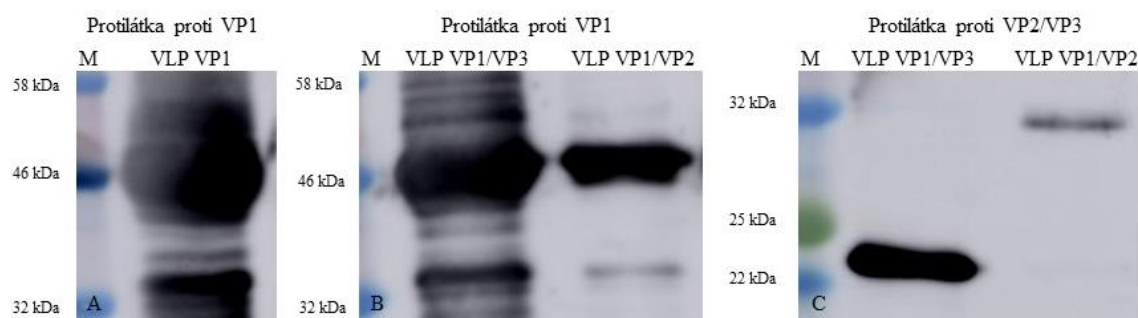
**Obrázek 9: VP1 je acetylovaný ve virové částici.** Virové částice byly z infikovaných buněk izolovány ultracentrifugací přes sacharózový polštář nebo byly dále přečištěny v CsCl gradientu. VP1 protein byl imunoprecipitován protilátkou proti VP1, vzorky byly separovány v gradientovém gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Pro detekci virových proteinů byly použity specifické protilátky proti VP1 (A) a acetylovanému lyzinu (B). Čísly jsou označeny proužky, které byly detekovány protilátkami: 1 = lehký řetězec protilátky VP1, 2 = monomerní VP1, 3 = hyperacetylovaná forma VP1, 4 dimer VP1, 5 a 6 = multiproteinové komplexy VP1 proteinu.

### 5.1.2 Vliv minoritních strukturních proteinů na efektivitu acetylace hlavního kapsidového proteinu

Na posttranslačních modifikacích proteinu VP1 se podílí minoritní strukturní proteiny (Li *et al.*, 1995a). Chtěli jsme proto zjistit, zda je přítomnost minoritních strukturních proteinů potřebná pro acylaci proteinu VP1, popřípadě jestli dokážou ovlivňovat efektivitu acetylce majoritního strukturního proteinu myšího polyomaviru. Proto jsme detekovali množství acetylovaného proteinu VP1 v částicích složených ze samotného proteinu VP1 a dále v částicích obsahujících jeden minoritní

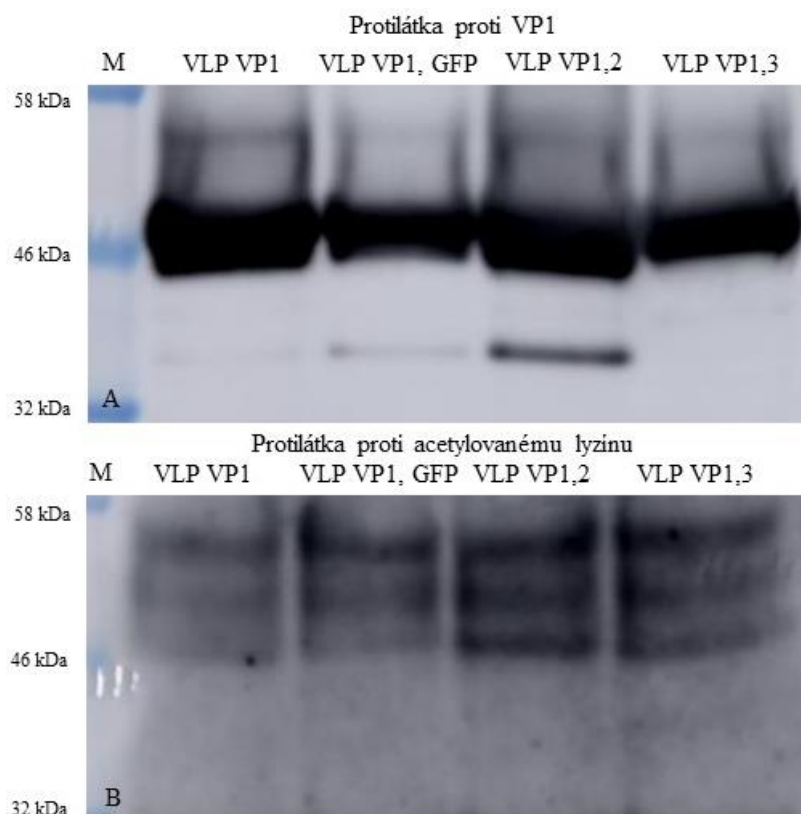
protein - v částicích VP1/VP2 a VP1/VP3. Dále nás zajímalo, jestli je nutná přítomnost minoritního proteinu v částici, nebo stačí pouze konformační změna zajištěná navázáním minoritního proteinu do kavity VP1 pentameru, proto jsme detekovali množství proteinu VP1 v částicích složených z VP1 a zkrácené formy VP3 (VP1/EGFP - tVP3) proteinu fúzaného s EGFP proteinem na jeho C' konci. Tento fúzní protein obsahuje sekvenci minoritního proteinu, která zaručuje jeho vazbu do kavity VP1 pentametu (Bouřa *et al.*, 2005). Vzhledem k tomu, že individuálně exprimovaný protein VP1 v savčích buňkách není efektivně transportován do jádra (Horníková *et al.*, 2017; Soldatová *et al.*, 2018) a tím pádem nedochází ani k efektivní tvorbě částic, byly VLPs izolovány po heterologní expresi v hmyzích buňkách. Hmyzí buňky byly infikovány rekombinantními bakuloviry a 72 hpi byly izolovány částice. Buněčný pelet byl homogenizován a byly provedeny dvě ultracentrifugace, nejprve přes polštář sacharózy 10 % a následně v gradientu CsCl. Po provedení druhé ultracentrifugace jsme ve sloupci roztoku pozorovali opaleskující proužek odpovídající VLPs složených z virových strukturních proteinů. Proužek byl odebrán pomocí injekční stříkačky a po dialýze jsme provedli kontrolu identity izolovaných VLPs. Částice VP1 a VP1/EGFP - tVP3 byly poskytnuty Mgr. Martinem Fraiberkem, Ph.D.

Identita jednotlivých typů částic byla ověřena metodou western blot. Vzorky proteinů byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu, přeneseny na membránu a strukturní proteiny polyomavirů byly detekovány specifickými protilátkami. Na membráně byly detekovány proužky VP1 proteinu, monomerní protein o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa a pruhy s nižší mobilitou (izoformy VP1) a degradáty tohoto proteinu (pruhy s vyšší mobilitou) (obrázek 10). U VLPs složených z VP1/VP2, respektive VP1/VP3 proteinu, jsme detekovali také VP2 a VP3 proteiny o relativní molekulové hmotnosti 32 respektive 23 kDa.



**Obrázek 10: VLP částice odvozené od virových strukturních proteinů.** Viro podobné částice složené z proteinu VP1, VP1/VP2 a VP1/3 byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu. VP1, VP2 a VP3 proteiny byly detekovány specifickými protilátkami. Na obrázku A je vzorek proteinů částic složených pouze z VP1 proteinu, na obrázcích B a C jsou vzorky virových proteinů z částic složených z VP1/VP2 a VP1/VP3 proteinů. Kromě monomerní formy VP1 proteinu byly detekovány také odlišné izoformy VP1 proteinu o nižší nebo vyšší molekulové hmotnosti, představující izoformy VP1 nebo degradáty. Minoritní strukturní proteiny myšího polyomaviru zvyšují efektivitu acetylace proteinu VP1.

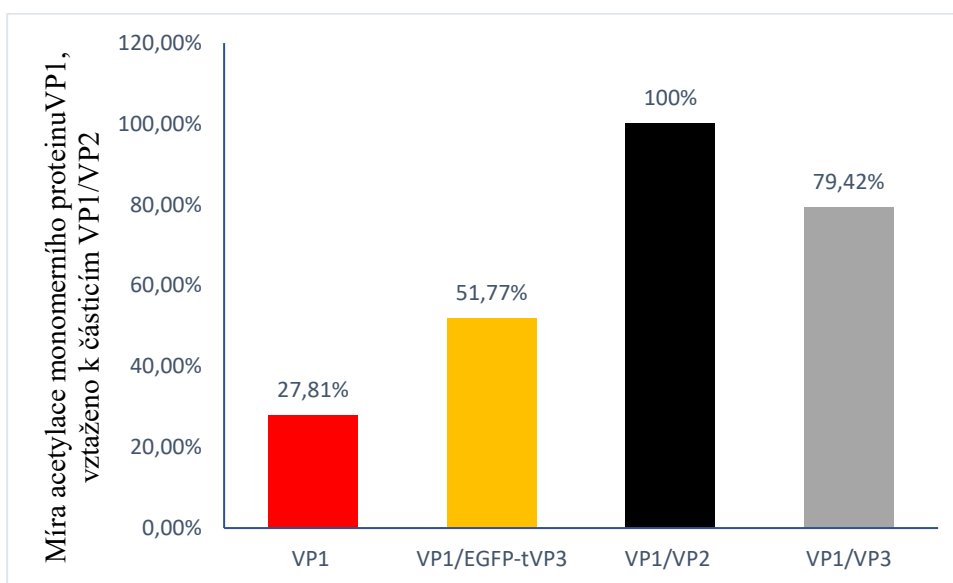
Přítomnost acetylovaného proteinu VP1 byla testována jako v předchozím případě. Částice byly ze vzorku precipitovány protilátkou proti proteinu VP1. Do každé reakce bylo vloženo 5  $\mu$ g proteinů. Imunoprecipitované vzorky byly separovány v gradientovém gelu a následně byly přeneseny na membránu metodou western blot. V jednotlivých vzorcích byly detekovány specifickými protilátkami proteiny VP1 a jejich acetylované formy. Monomerní forma proteinu VP1 o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa byla detekována ve všech vzorcích, dále byla detekována také izoforma proteinu VP1 o relativní molekulové hmotnosti přibližně 52 kDa (obrázek 11). Dále byly detekovány proužky o relativní molekulové hmotnosti přibližně 35 kDa u všech typů částic, kromě částic složených z proteinů VP1/VP3. Jedná se pravděpodobně o degradovanou formu VP1 proteinu. Signál acetylovaných lyzinů byl detekován u všech analyzovaných vzorků v podobě 3 proužků. Detekovali jsme pruhy o velikosti 46 kDa, odpovídající monomeru proteinu VP1, a 52 kDa odpovídající jedné izoformě proteinu VP1. Signál těchto 2 pruhů se překrýval se signálem proteinu VP1 a patrně představuje acetylované formy proteinu VP1. Proužek o relativní molekulové hmotnosti asi 48 kDa pravděpodobně představoval další acetylovanou formu proteinu VP1. Tato izoforma odpovídala svou mobilitou horní části pruhu VP1 o molekulové hmotnosti 46 kDa. Je tedy možné, že VP1 signál této izoformy je „překryt“ signálem monomerního proteinu VP1.



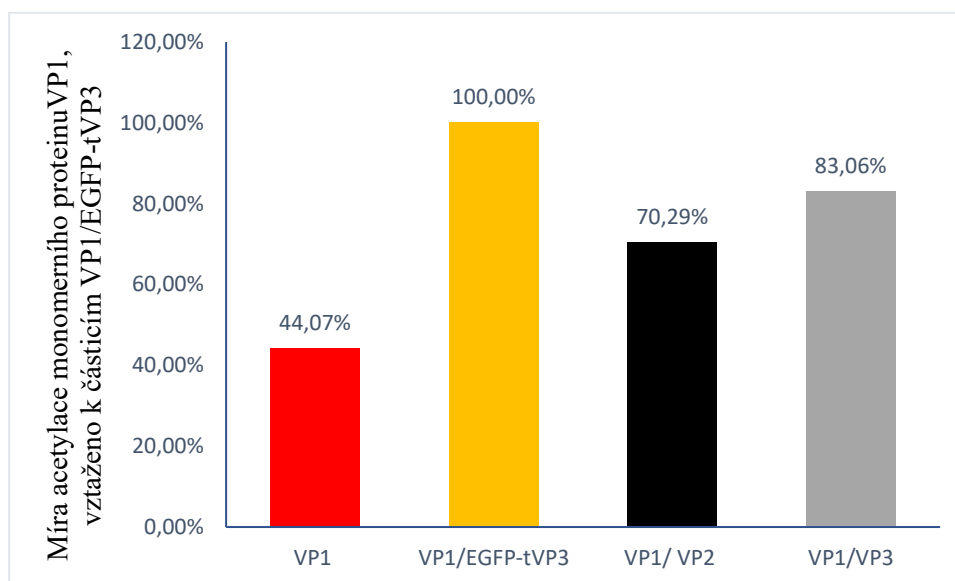
**Obrázek 11: Acetylace VP1 proteinů v částicích složených z VP1, VP1/VP2, VP1/VP3, VP1/EGFP-tVP3 proteinů.** Izolované VLPs byly imunoprecipitovány protilátkou proti VP1. Precipitované proteiny byly separovány v gradientovém polyakrylamidovém gelu, přeneseny na membránu a následně byly proteiny značeny specifickými protilátkami proti VP1 proteinu a acetylovanému lyzinu. Proužky o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa odpovídají monomernímu VP1 proteinu. Proužky o relativních molekulových hmotnostech 48 a 52 kDa představují odlišně acetylované izoformy proteinů VP1. Proužek o relativní molekulové hmotnosti asi 35 kDa je nejspíše produktem degradace VP1 proteinu.

Dále nás zajímalo, jestli se liší míra acetylce proteinu VP1 mezi jednotlivými částicemi. Denzita signálu acetylovaného lyzinu v pruzích o velikosti 46 kDa a 52 kDa byla vztažena k denzitě signálu VP1 příslušných pruhů. Tyto hodnoty byly porovnány mezi jednotlivými částicemi. Při analýze bylo zjištěno, že monomer proteinu VP1 (46 kDa) je nejvíce acetylovaný v částicích složených z proteinů VP1/VP2 (graf 1). Monomer proteinu VP1 u VP1/VP3 částic byl acetylovaný o 20,58 % méně a u částic VP1/EGFP - tVP3 o 48,23 % méně v porovnání s VP1/VP2 částicemi. Ze všech zkoumaných částic byl monomer proteinu VP1 nejméně acetylován u těch částic, které byly tvořeny pouze VP1 proteinem. Míra acetylce byla o 72,19 % nižší v porovnání s částicemi VP1/VP2. Při analýze hyperacetylované formy VP1 proteinu byla situace poněkud odlišná. Nejvíce acetylovaná izoforma

byla detekována u částice sestavené z proteinů VP1/EGFP - tVP3 (graf 2). O 17 %, respektive o 29,71 % méně by byly acetylovány izoformy v částicích VP1/VP3 a VP1/VP2. Vůbec nejméně (o 56,93 %) byla opět acetylována izoforma v částicích sestavených pouze z proteinu VP1 v porovnání s částicemi VP1/EGFP - tVP3. Získané výsledky naznačují, že protein VP1 je acetylován i v nepřítomnosti minoritních proteinů. Nicméně, minoritní proteiny výrazně zvyšují efektivitu jeho acetylce.



**Graf 1: Graf ukazuje hladinu acetylce monomeru proteinu VP1 normalizovanou množstvím monomeru proteinu VP1 a vztaženou hladinu v VP1/VP2 částicích.** Porovnání míry acetylce VP1 proteinu ve VLPs částicích. VLPs byly izolovány z buněčných lyzátů ultracentrifugací přes 10% sacharózu a následně v gradient CsCl. Vzorky byly separovány v 10 % polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu. Pro detekci proteinů byly použity protilátky rozlišující acetylovaný lyzin.



**Graf 2:** Graf ukazuje hladinu acetylce hyperacetylované formy proteinu VP1 normalizovanou množstvím monomeru proteinu VP1 a vztahenou hladinu v VP1/VP2 částicích. Porovnání míry acetylce hyperacetylované izoformy VP1 proteinu ve VLPs částicích. VLPs byly izolovány z buněčných lyzátů ultracentrifugací přes 10% sacharózu a následně v gradient CsCl. Vzorky byly separovány v 10 % polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu. Pro detekci proteinů byly použity protilátky rozlišující acetylovaný lyzin.

### 5.1.3 VP1 protein myšího polyomaviru je substrátem HDAC6

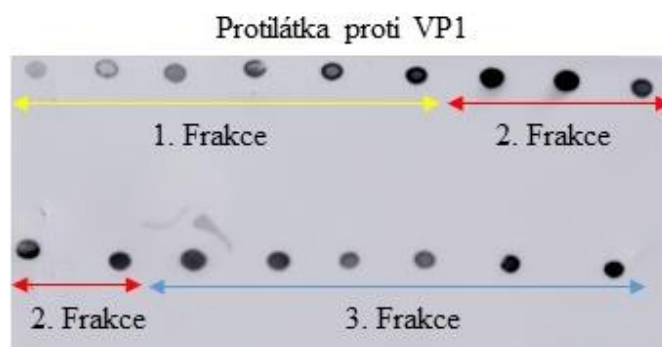
Dále nás zajímalo, jestli je protein VP1 substrátem HDAC6. Izolovali jsme proto virus z buněk s defektním genem pro HDAC6. Tyto HDAC6 KO buňky byly poskytnutých RNDr. Lenkou Horníkovou, Ph.D. Jako kontrolní virus byl použit virus izolovaný z rodičovské linie myších fibroblastů 3T6 (kap. 4.43). Buňky HDAC6 KO byly infikovány myším polyomavirem a izolace viru byla zahájena poté, co přibližně 80 % infikovaných buněk vykazovalo cytopatický efekt. Virus byl postupně izolován ultracentrifugací přes sacharózový polštář a následně v gradientu CsCl. Po centrifugaci v chloridu cesném byl gradient rozebrán na jednotlivé frakce, každá asi po 500  $\mu$ l. V každé frakci byl změřen refraktometrický index (tabulka 9) a přítomnost proteinu VP1 byla testována metodou dot blot (obrázek 12). Na základě těchto hodnot byly vzorky spojeny do 3 frakcí. První frakce (označená žlutě) obsahuje pouze malé množství virových částic. Vzorky druhé frakce (označená červeně) měly refraktometrické indexy v rozpětí 1,3665 - 1,363 a obsahovaly převážně virové částice. Vzorky třetí (označená modře) frakce obsahovaly převážně „prázdné“ virové kapsidy,

neobsahující DNA. Spojené frakce byly dialyzovány proti pufru B, koncentrovány centrifugací přes sacharózový polštář a rozpuštěny v pufru B. Pro následné analýzy byla použita frakce č. 2.

Izolace viru z HDAC6 KO buněk
HDAC 6 KD
1,379
1,3765
1,374
1,3715
1,3695
1,367
1,3665
1,3665
1,3645
1,3635
1,363
1,3625
1,361
1,3595
1,3585
1,3585

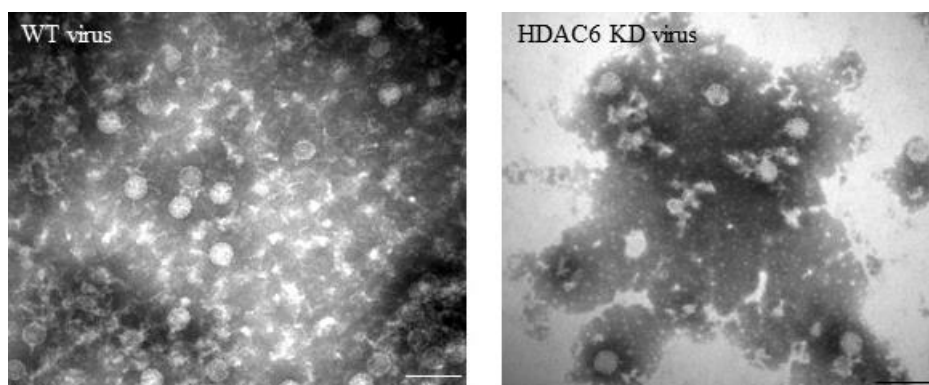
**Tabulka 9: Refraktometrické indexy jednotlivých frakcí po izolaci viru z HDAC6 KO buněk.**

Refraktometrické indexy byly změřeny u vzorků virové suspenze odebrané po centrifugaci v gradientu CsCl. Žlutě jsou označeny vzorky tvořící tzv. těžkou frakci. Do této frakce byly zařazeny vzorky, jejichž refraktometrický index se pohyboval v rozmezí 1,379 - 1,367 obsahující pouze malé množství částic. Červeně jsou označeny vzorky frakce 2, které byly použity pro následující experimenty. Vzorky této frakce obsahovaly infekční virové částice a jejich refraktometrické indexy se nacházely v rozsahu 1,3665 - 1,363. Modře jsou označeny vzorky spadající do tzv. lehké frakce, ve které se nacházely hlavně prázdné virové kapsidy a jejich refraktometrické indexy se nacházely mezi 1,3625 a 1,3585.



**Obrázek 12: Detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích metodou dot blot.** Virové částice byly izolovány ultracentrifugací přes polštář 10% sacharózy a v gradientu CsCl. V jednotlivých vzorcích odebraných z CsCl gradientu byl detekován VP1 protein. Hlavní strukturní protein myšího polyomaviru byl přítomný ve všech třech frakcích. Největší intenzita signálu byla pozorována u 2. frakce, která obsahuje infekční virové částice.

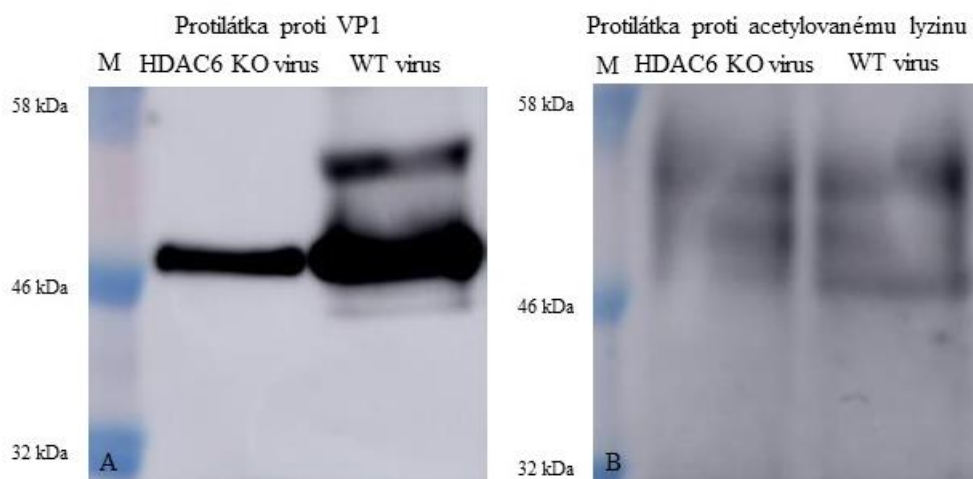
Abychom zjistili, zda jsme izolovali virové částice o správné morfologii, byly připraveny vzorky pro elektronovou mikroskopii. Virové částice byly vizualizovány metodou negativního barvení. Analyzovány byly vzorky divokého typu a virus produkovaný buňkami deficientními na HDAC6. Na snímcích z elektronového mikroskopu (obrázek 13) byly pozorovány částice obou typů virů o stejné morfologii a velikosti. V obou vzorcích virových částic bylo pozorováno určité množství prázdných virových částic. Podle těchto výsledků se virové částice tvořily i v buňkách deficientních na HDAC6.



**Obrázek 13: Elektronový snímek virových částic izolovaných z divokého typu buněk a buněk deficientních na HDAC6.** Virus byl kontrastován kyselinou fosfowolframovou a pozorován v elektronovém mikroskopu. Virové částice byly pozorovány v obou typech vzorků. Měřítka je 100 nm.



Přítomnost acetylovaného proteinu VP1 v izolátu z buněk HDAC6 KO (HDAC6 KO virus) byla porovnána s izolátem z buněk 3T6 (WT virus). Protein VP1 byl imunoprecipitován pomocí specifické protilátky, do jedné imunoprecipitační reakce bylo vloženo 5 µg proteinů. Vzorky byly separovány na gradientovém polyakrylamidového gelu a následně byly separované proteiny přeneseny na membránu. Detekován byl protein VP1 a acetylovaný lyzin pomocí specifických protilátek. Specifickou protilátkou proti VP1 byl na membráně pozorován jeden proužek o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa u HDAC6 KO viru. V případě divokého typu viru byly detekovány proužky odpovídající VP1 v oblasti 46 kDa a proužek v oblasti asi 52 kDa odpovídající pravděpodobně hyperacetylovaným formám VP1 proteinu. Při detekci acetylovaných forem VP1 proteinů byly pozorovány 3 proužky odpovídající acetylovaným izoformám VP1. Proužek detekovaný jako izoforma s nejvyšší relativní molekulární hmotností pravděpodobně odpovídá hyperacetylované formě. Proužek s relativní molekulovou hmotností asi 48 - 50 kDa mohl být při detekci VP1 proteinu „překryt“ silným signálem VP1 proteinu HDAC6 KO viru. Proužek s relativní molekulovou hmotností 46 kDa odpovídá acetylované formě proteinu VP1 (obrázek 14).



**Obrázek 14: VP1 je substrátem HDAC6.** Proteiny byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a následně značeny specifickými protilátkami. Proužek o relativní molekulární hmotnosti asi 52 kDa představuje hyperacetylovanou formu VP1 proteinu myšího polyomaviru. Proužky o relativní molekulární hmotnosti asi 46 kDa odpovídají monomerní formě VP1 proteinu. Na druhém snímku je možné pozorovat proužky o relativních molekulových hmotnostech 46, 48 a 52 kDa a jedná se o acetylované izoformy VP1.

Monomer proteinu VP1 viru HDAC6 KO byl průměrně acetylován o 3,4 % více než monomer VP1 proteinu divokého typu viru. Ve srovnání s divokým typem viru

byla detekována hyperacetylovaná forma VP1 proteinu tohoto viru pouze při detekci acetylovaných forem VP1. Tato izoforma proteinu VP1 je tedy výrazně více acetylovaná, než stejná forma u viru izolovaného z buněk 3T6.

#### **5.1.4 Vliv HDAC6 KO na infektivitu virových částic**

Nakonec nás zajímalo, jestli zvýšená acetylace proteinu VP1 ovlivňuje infektivitu viru. Nejdříve jsme určili počet genomů v jednom  $\mu\text{l}$  virové suspenze, abychom mohli infikovat buňky stejným množstvím viru. Izolovali jsme DNA z jednotlivých virových izolátů a množství virových genomů jsme určili qPCR. V 1  $\mu\text{l}$  izolátu viru divokého typu bylo obsaženo  $3,29 \times 10^8$  genomů/ $\mu\text{l}$  a v HDAC6 KO izolátu bylo detekováno  $1,25 \times 10^6$  genomů na 1  $\mu\text{l}$ .

Buňky linie 3T6 byly infikovány  $3,3 \times 10^5$  genomy na buňku, 24 hpi byl detekován LT antigen specifickou protilátkou a byl spočítán počet LT pozitivních buněk na pole (tabulka 10 a 11). Infektivita HDAC6 KO viru byla o 50 % nižší než infektivita divokého typu viru ve dvou nezávislých experimentech. Tyto výsledky ukazují, že infektivita virového potomstva produkovaného v buňkách deficientních na HDAC6 je asi o 50 % nižší než infektivita virového potomstva produkovaného buňkami divokého typu. Hyperacetylace proteinu VP1 má pravděpodobně negativní vliv na schopnost viru infikovat buňky.

HDAC6 KO virus		WT virus	
Pole	Počet infikovaných buněk	Pole	Počet infikovaných buněk
1	0	1	5
2	1	2	6
3	0	3	5
4	4	4	2
5	1	5	6
6	3	6	5
7	0	7	0
8	0	8	1
9	2	9	7
10	1	10	10
11	3	11	1
12	7	12	4
13	3	13	4
14	1	14	6
15	5	15	1
16	4	16	3
17	4	17	2
18	0	18	6
19	0	19	3
20	1	20	6
Průměr na jedno zorné pole	2	Průměr na jedno zorné pole	4,15

**Tabulka 10: Vliv zvýšené acetylce proteinu VP1 na efektivitu infekce viru - experiment 1.** Buňky byly infikovány virem divokého typu a virem HDAC6 KO. Virové suspenze byly naředěny tak, aby bylo použito stejné množství virových genomů na buňku. 24 hpi byly buňky fixovány a LT pozitivní buňky byly označeny specifickou protilátkou. Byl spočítán průměrný počet infikovaných buněk na pole. Virus produkovaný v buňkách deficientních na HDAC6 byl o 50 % méně infekční než WT virus.

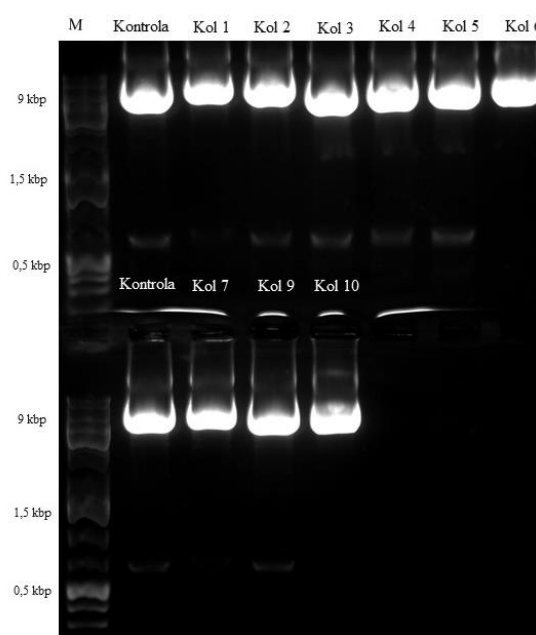
HDAC6 KO virus		WT virus	
Pole	Počet infikovaných buněk	Pole	Počet infikovaných buněk
1	10	1	6
2	1	2	2
3	11	3	4
4	9	4	8
5	2	5	8
6	5	6	7
7	4	7	8
8	7	8	16
9	0	9	14
10	0	10	17
11	1	11	8
12	3	12	4
13	3	13	10
14	6	14	12
15	4	15	4
16	1	16	15
17	7	17	12
18	1	18	9
19	5	19	0
20	5	20	0
Průměr na jedno zorné pole	4,25	Průměr na jedno zorné pole	8,2

**Tabulka 11: Vliv zvýšené acetylace proteinu VP1 na efektivitu infekce viru - experiment 2.** Buňky byly infikovány virem divokého typu a virem HDAC6 KO. Virové suspenze byly naředěny tak, aby bylo použito stejné množství virových genomů na buňku. 24 hpi byly buňky fixovány a LT pozitivní buňky byly označeny specifickou protilátkou. Byl spočítán průměrný počet infikovaných buněk na pole. Virus produkovaný v buňkách deficientních na HDAC6 byl o 50 % méně infekční než WT virus.

### 5.1.5 Příprava plazmidu umožňujícího expresi lidské HDAC6

Po zjištění, že VP1 tvořící virové částice je acetylován a také je substrátem HDAC6, jsme chtěli zjistit, jaký vliv na infektivitu má nadprodukce tohoto enzymu. Z platformy Addgene se nám podařilo získat expresní plazmid nesoucí sekvenci lidské HDAC6 mutované v katalytických doménách a fúzovanou s EGFP. Bohužel se nám nepodařilo získat plazmid s WT HDAC6, proto jsme se rozhodli připravit jeho WT variantu zpětnou mutací jeho katalytických domén (obrázek 15). Z analýzy sekvence vyplynulo, že mutovaná sekvence se liší oproti WT sekvenci ve dvou pozicích.

Záměny se nacházely v pozicích A646H a A1831H. Cílená mutagenese byla provedena ve dvou krocích podle návodu výrobce komerční soupravy Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit. Do reakce bylo vloženo 10 ng plazmidové DNA (pEGFP.N1 - HDAC6.DC). Teplota pro nasedání primerů (kap. 4.19) byla nastavena na 65 °C. Po dokončení první mutagenese byla plazmidová DNA izolována z transformovaných bakterií, sekvenována a použita jako templát pro mutagenesi další oblasti. Do reakce bylo vloženo 10 ng plazmidové DNA. Teplota pro nasedání primerů (kap. 4.19) byla nastavena na 68 °C.

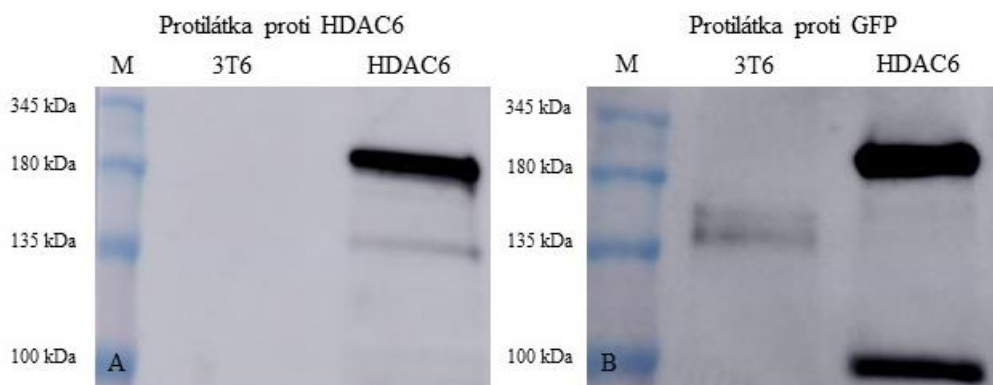


**Obrázek 15: Remutované plazmidové konstrukty kódující lidskou HDAC6.** Abychom ověřili, zda se po PCR reakci produkovaly konstrukty správné velikosti, provedli jsme po dokončení PCR reakce elektroforézu v 1% agarózovém gelu. Na elektroforetogramu byly detekovány proužky o velikosti asi 7 - 9 kbp, které odpovídaly velikosti templátového plazmidu vloženého do reakce. Jako kontrola byl použit nemutovaný plazmidový konstrukt s HDAC6 DC.

Po izolaci DNA byly vybrané kolonie sekvenovány a výsledek reakce byl vyhodnocen pomocí programu MEGA X. Zmíněným postupem byla získaná HDAC6 se sekvencí shodnou s divokým typem lidské HDAC6. U 6 z 9 kolonií bylo dosaženo záměny, jak na pozici 646, tak i 1831 bp. Pro další práci byl zvolen konstrukt z kolonie 10 a označen jako plazmid pHDAC6-EGFP.

Po provedení mutagenese jsme potřebovali ověřit, zda se HDAC6 - EGFP

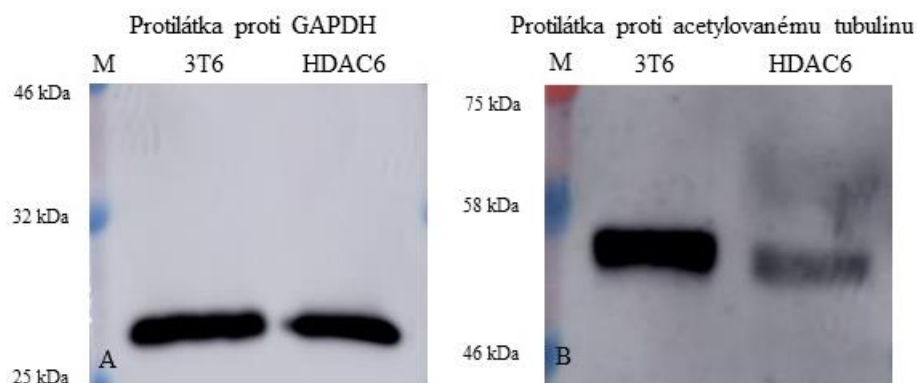
z tohoto konstruktu exprimuje v buňkách. Připravený plazmidový konstrukt byl elektroporací vnesen do 3T6 buněk. Po 24 h byly buňky lyzovány, lyzáty byly separovány v 10 % polyakrylamidovém gelu a separované proteiny byly přeneseny na membránu metodou western blot. Přítomnost fúzního proteinu byla potvrzena protilátkami specificky rozpoznávajícími EGFP a HDAC6. HDAC6 - EGFP jsme detekovali pomocí protilátky specifické proti HDAC6 (obrázek 16 A). Na tomto snímku můžeme pozorovat proužek odpovídající fúznímu proteinu HDAC6 - EGFP (přibližně 180 kDa), pozorovali jsme také slabý proužek, který byl pravděpodobně degradátem cíleného proteinu (přibližně 135 kDa). Ve vzorku připraveného z netransfekovaných buněk jsme nedetekovali žádný proužek, který by odpovídal endogenní HDAC6. Pro potvrzení jsme použili také protilátkou proti GFP (obrázek 16 B). Na membráně jsme detekovali proužek, který odpovídal HDAC6 - EGFP (přibližně 180 kDa) a proužek o nižší relativní molekulové hmotnosti, jednalo se nejspíše opět u určitý degradát proteinu (přibližně 100 kDa). Ve vzorku připraveném z netransfekovaných 3T6 buněk jsme pozorovali proužky (přibližně 135 a 150 kDa), které byly nejspíše produktem nespecifických interakcí protilátky rozlišující GFP.



**Obrázek 16: HDAC6 se exprimuje v transfekovaných buňkách.** Buňky 3T6 byly transfekovány plazmidem HDAC6 - EGFP a 24 hpt byly buňky lyzovány. Lyzáty byly separovány 8% elektroforézou a přítomnost fúzního proteinu byla detekována protilátkami proti GFP nebo HDAC6. Značkou M je označen marker molekulárních hmotností. Na prvním i druhém snímku je možné pozorovat proužek o relativní molekulární hmotnosti asi 180 kDa, tento proužek odpovídá HDAC6 - EGFP. Další proužky o relativní molekulové hmotnosti asi 135 kDa a asi 140 kDa jsou pravděpodobně degradáty HDAC6 a nespecifické interakce protilátky rozlišující GFP.

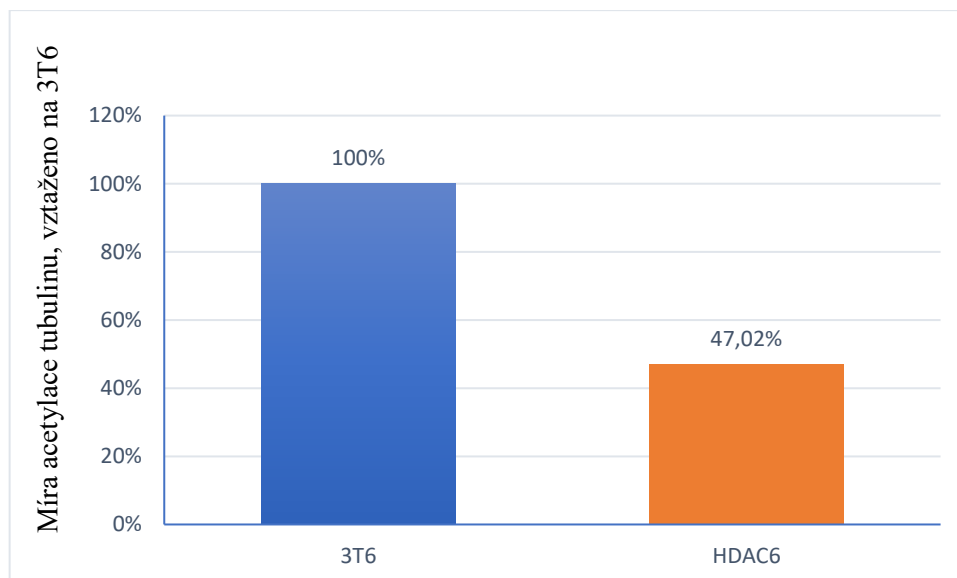
Následně jsme potřebovali ověřit, jestli je HDAC6 katalyticky aktivní, proto jsme stanovili míru acetylace tubulinu v transfekovaných a netransfekovaných buňkách. Na membráně jsme detekovali proužky odpovídající acetylovanému tubulinu

(asi 50 kDa). Intenzita signálu byla výrazně slabší u vzorku připraveného z buněk nadprodukujících HDAC6 (obrázek č. 17 A a B).



**Obrázek 17: HDAC6 EGFP exprimovaná z konstruktu pHDAC6-EGFP je katalyticky aktivní.** Buňky 3T6 byly transfekovány plazmidem HDAC6 - EGFP (HDAC6) a 24 hpt byly buňky lyzovány. Lyzáty byly separovány 8% elektroforézou. Acetylovaný tubulin a GAPDH byly detekovány pomocí specifických protilátek. Zatímco množství GAPDH bylo mezi buňkami 3T6 a buňkami nadprodukujícími HDAC6 - EGFP prakticky stejné, množství acetylovaného tubulinu bylo výrazně nižší v buňkách nadprodukujících HDAC6 - EGFP

Následnou analýzou optických denzit jsme zjistili, že tubulin v buňkách s endogenní HDAC6 byl acetylován o 52,98 % více než v buňkách, které nadprodukovaly lidskou HDAC6-EGFP. Tato data ukazují, že se nám podařilo připravit konstrukt, jehož transfekce do buněk vede k nadprodukci katalyticky aktivní HDAC6 (graf 3).

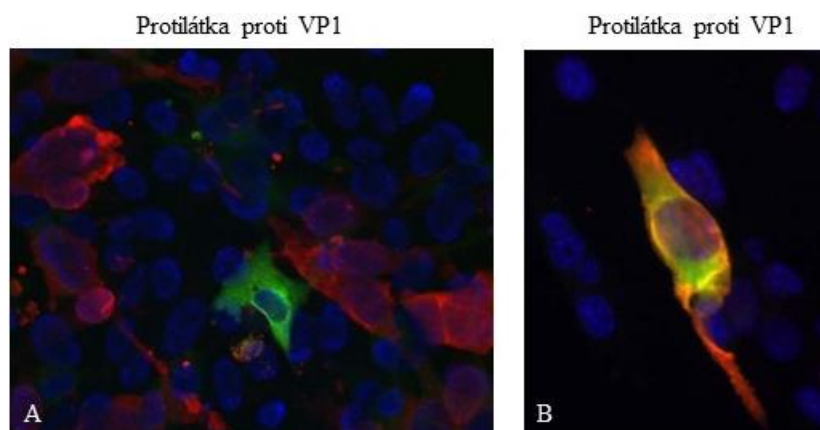


**Graf 3: Míra acetylace tubulinu v buňkách nadprodukujících HDAC6 - EGFP.** Porovnání míry acetylace tubulinu v buňkách, které nadprodukovaly HDAC6 s acetylací tubulinu v divokém typu buněk. Buňky byly transfekovány konstruktem kódujícím lidskou HDAC6 - EGFP (HDAC6). Po 24 h byly připraveny buněčné lyzáty. Vzorky byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu. Pro detekci proteinů byly použity protilátky rozlišující acetylovaný tubulin. Hladina acetylovaného tubulinu byla normalizována na hladinu GAPDH a porovnána s buňkami 3T6.

#### 5.1.6 Nadprodukce HDAC6 - EGFP má negativní vliv na infektivitu myšího polyomaviru

Buňky 3T6 byly transfekovány připraveným konstruktem HDAC6 - EGFP. Po 24 h byly buňky infikovány myším polyomavirem, fixovány 40 h po infekci a nepřímou fluorescencí byl označen protein VP1. Na obrázku 18 je ukázán výsledek imunofluorescenčního značení. Pozorovali jsme buňky exprimující HDAC6 - EGFP. Tyto buňky měly zeleně zbarvenou cytoplazmu, ve které se nacházela HDAC6 - EGFP. Červeně zbarvená cytoplazma buněk byla způsobena vazbou protilátky na protein VP1 v jádře a v cytoplasmě infikovaných buněk. Buňky, které byly infikovány myším polyomavirem a exprimovaly HDAC6 - EGFP, byly zbarveny oranžově nebo žlutě (obrázek 18).





**Obrázek 18:** Buňky linie 3T6 byly transfekovány plazmidem HDAC6 - GFP (zeleně) a 24 hpt byly infikovány myším polyomavirem. Buňky byly fixovány 40 hpi a protein VP1 (červeně) byl označen specifickou protilátkou. DNA byla nespecificky obarvena DAPI. HDAC6 byla detekována prostřednictvím GFP značky. Pod mikroskopem jsme pozorovali neinfikované buňky 3T6 (snímek A modrá jádra), infikované buňky 3T6 (snímek A červená cytoplazma a fialová jádra) a buňky nadprodukující HDAC6 (snímek A zelená cytoplazma). Posledním typem pozorovaných buněk byl ten, který exprimoval HDAC6 a zároveň byly infikovány myším polyomavirem (snímek B žlutá cytoplazma).

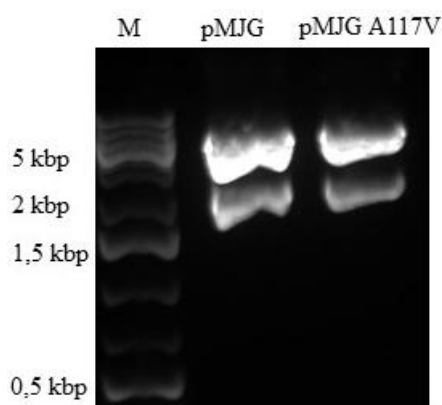
Následně jsme spočítali počet infikovaných 3T6 buněk a počet infikovaných buněk nadprodukujících HDAC6 - EGFP. Z počtu 320 3T6 buněk bylo myším polyomavirem infikováno 115 buněk, tedy asi 35,94 %. Buněk nadprodukujících HDAC6 - EGFP bylo 50 a pouze 5 z nich bylo infikováno myším polyomavirem, což je 10 %. Z těchto dat se nám podařilo zjistit, že buňky nadprodukující HDAC6 - EGFP jsou infikovány o přibližně 72 % méně než buňky linie 3T6. Získaná data naznačují, že nadprodukce HDAC6 - EGFP má negativní efekt na schopnost myšího polyomaviru navodit produktivní infekci hostitelských buněk.

## 5.2 Studium N' terminální acetylace

Už dříve bylo zjištěno, že virus s mutací zabraňující N koncové acetylaci proteinu VP3 je neinfekční (Mariničová 2017). Protože je známo, že na infektivitu viru mají vliv minoritní strukturní proteiny, chtěli jsme zjistit, jaké je jejich zastoupení ve virových částicích divokého a mutovaného typu a jestli jejich případné rozdílné zastoupení nemůže vysvětlit sníženou infektivitu virové mutanty.

### 5.2.1 Příprava divokých a mutovaných virových genomů

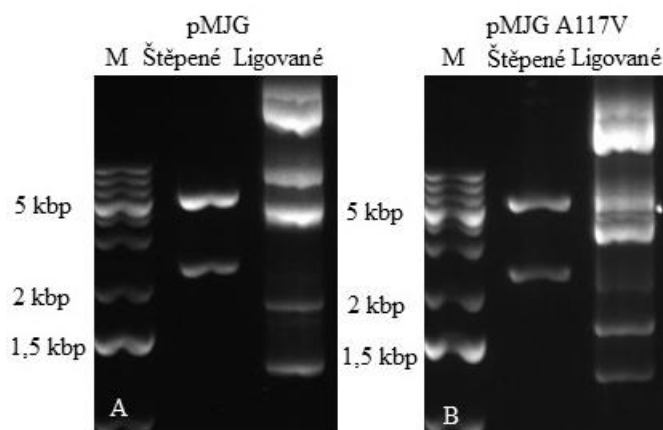
Byly izolovány plazmidové konstrukty kódující genom divokého typu (pMJG - WT) viru a konstrukt se sekvencí virové mutanty, jejíž protein VP3 nemůže být acetylován (pMJG - A117V). Plazmidy byly následně štěpeny restriktivním enzymem EcoRI za účelem vyštěpení virového genomu z plazmidu. Efektivita štěpení byla ověřena elektroforézou (obrázek 19). Na elektroforetogramu jsou vizualizovány štěpené konstrukty pMJG divokého a mutovaného typu. Proužky o velikosti přibližně 5300 párů bazí a 2300 párů bazí odpovídaly sekvenci virového genomu, respektive plazmidového vektoru.



**Obrázek 19: Restriktivní štěpení plazmidů pMJG a pMGJ mut. Plazmidy byly štěpeny restriktivní endonukleázou EcoRI a produkty reakce byly separovány na 1% agarózové elektroforéze. Pozorovali jsme proužky velikostí odpovídající sekvenci virového genomu (asi 5000 bp) a kostře plazmidového konstruktu asi 2 kbp.**

Následně jsme směs obou fragmentů použili pro ligační reakci. Ligace byla provedena s pomocí T4 DNA ligázy a do reakce jsme vložili nízkou koncentraci DNA. Celkový objem reakce byl velký, což bylo zvoleno proto, aby proběhla preferovaná intramolekulární ligace. Po provedení ligace jsme produkty reakce sráželi ve směsi octanu sodného a ethanolu a účinnost reakce jsme ověřili elektroforetickou separací (obrázek 20). Na elektroforetogramu pozorujeme řadu produktů ligační reakce. Jedná se o: Intramolekulárně ligovaný genom MPyV (fragment o velikosti cca 5000 bp), intramolekulárně ligovaný bakteriální vektor (velikost cca 1500 bp), původní plazmid

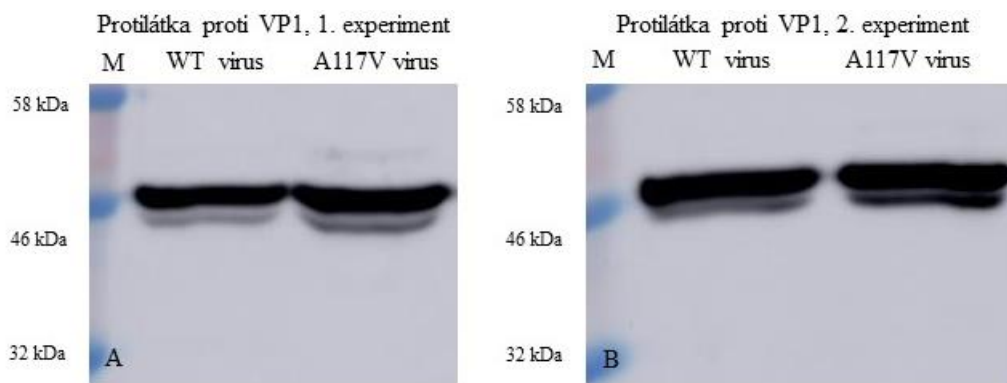
(genom a vektor) a také širokou škálu násobně ligovaných i neligovaných genomů a vektorů a jejich kombinací. Recirkularizované genomy jsme použili k transfekci 3T3 myších fibroblastů elektroporací.



**Obrázek 20: Produkty ligace naštěpených plazmidů pMJG a pMJG - A117V.** Ligační směsi byly separovány na 1% agarózové elektroforéze. Byla pozorována řada produktů včetně intramolekulárně ligovaného genomu MPyV (5000 bp), intramolekulárně ligovaného bakteriálního vektoru (1500 bp), původní plazmid (genom a vektor) a širokou škálu násobně ligovaných i neligovaných genomů a vektorů a jejich kombinací. M – marker (velikosti v bp).

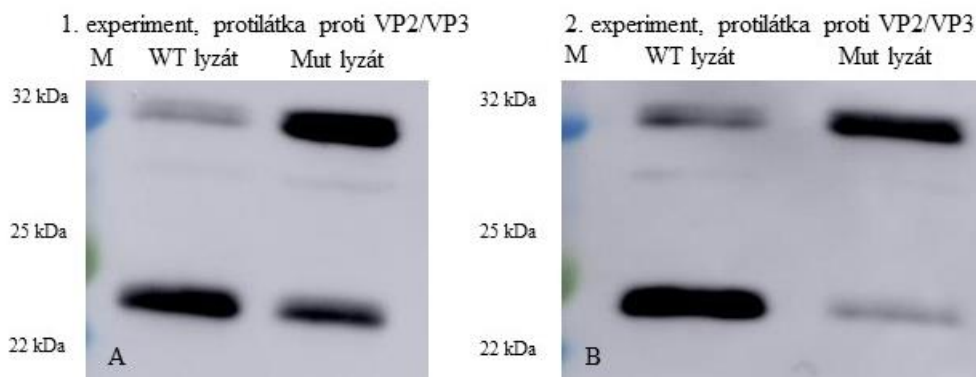
### 5.2.2 Zastoupení minoritních proteinů v lyzátech buněk transfekovaných religovanými genomy WT viru a mutovaného viru

Buňky linie 3T3 byly transfekovány religovanými genomy WT - viru a mutovaného viru. Buněčné lyzáty byly připraveny po 72 h. Vzorky byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu metodou western blot. Strukturní proteiny byly detekovány specifickými protilátkami. Protein VP1 byl detekován v obou vzorcích ve své monomerní podobě (obrázek 21).



**Obrázek 21: Množství VP1 v buněčných lyzátech.** Buňky byly transfekovány religovanými genomy WT viru a A117V viru a 72 hpt lyzovány. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP1. Proteinu VP1 odpovídá proužek o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa. Ukázány jsou výsledky 2 nezávislých experimentů.

Zastoupení minoritních virových strukturních proteinů v lyzátech získaných z buněk transfekovaných WT nebo mutovaným typem pMJG plazmidu bylo výrazně rozdílné. Protein VP3 byl v lyzátu divokého typu viru exprimován ve výrazně vyšší míře než protein VP2. V případě lyzátů mutovaného typu viru byla situace opačná a množství proteinu VP2 výrazně převyšovalo množství proteinu VP3 (obrázek 22). Stejného výsledku bylo dosaženo i v 2. nezávislém experimentu.



**Obrázek 22: Zastoupení proteinů je v mutovaném a divokém typu lyzátu rozdílné.** Buňky byly transfekovány religovanými genomy WT viru a A117V viru a 72 hpt lyzovány. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP2/VP3. Ukázány jsou výsledky 2 nezávislých experimentů.

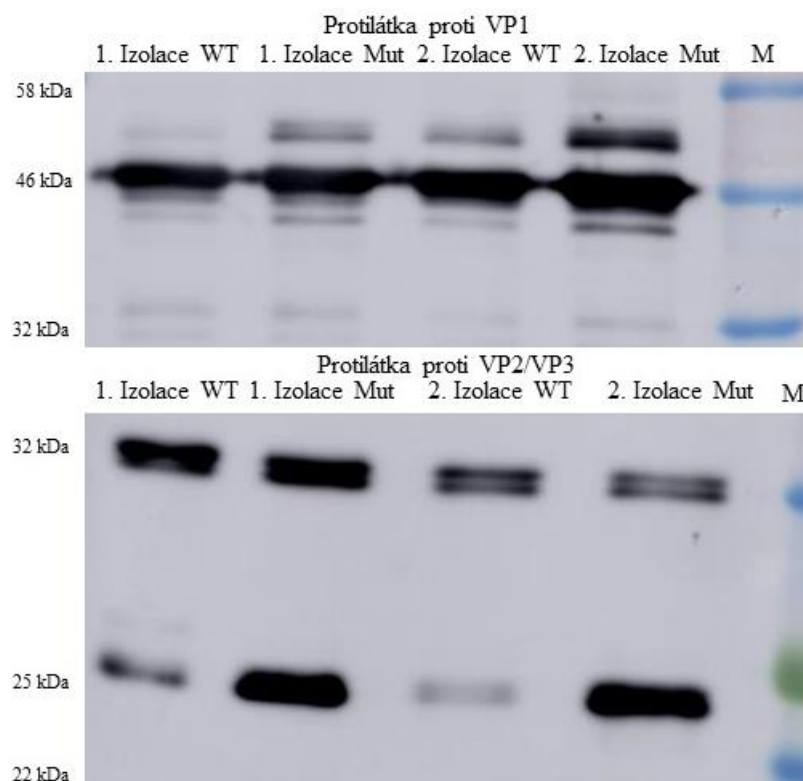
### 5.2.3 Zastoupení minoritních proteinů ve virových částicích je odlišné mezi WT virem a mutovaným virem

Po zjištění, že zastoupení minoritních proteinů se liší v lyzátech buněk po transfekci religovanými genomy, zajímalo nás, jestli se tento rozdíl bude odrážet i ve složení virových částic. Buňky linie 3T3 byly transfekovány religovanými genomy WT viru a mutovaného viru. Virus byl izolován 72 h po transfekci. Izolace viru byla zahájena poté, co přibližně 80 % infikovaných buněk vykazovalo cytopatický efekt. Virus byl izolován ultracentrifugací přes polštář 10% sacharózy a suspenze následně byla přečištěna v gradientu CsCl. Gradient CsCl byl rozebrán na vzorky o objemu přibližně 500  $\mu$ l. U těchto vzorků byly změřeny refraktometrické indexy. Na základě těchto hodnot byly vzorky spojeny do 3 frakcí (tabulka 12). Pro následující experimenty byly použity vzorky, jejichž refraktometrické indexy se nacházely v rozpětí 1,3665 - 1,363 (tabulka 12), obsahující převážně viriony.

Třetí izolace viru	
WT virus	Mut virus
1,3765	1,383
1,3765	1,377
1,373	1,373
1,3705	1,3715
1,369	1,369
1,369	1,368
1,3675	1,367
1,366	1,3665
1,3655	1,366
1,365	1,3655
1,364	1,364
1,363	1,3635
1,3615	1,362
1,36	1,361

**Tabulka 12: Refraktometrické indexy jednotlivých frakcí po izolaci WT viru a A117V viru.** Refraktometrické indexy byly změřeny u vzorků virové suspenze odebrané po centrifugaci v gradientu CsCl. Žlutě jsou označeny vzorky tvořící tzv. těžkou frakci. Do této frakce byly zařazeny vzorky, jejichž refraktometrický index se pohyboval v rozmezí 1,383 - 1,367 obsahující pouze malé množství částic. Červeně jsou označeny vzorky frakce 2, které byly použity pro následující experimenty. Vzorky této frakce obsahovaly infekční virové částice a jejich refraktometrické indexy se nacházely v rozsahu 1,3665 - 1,363. Modře jsou označeny vzorky spadající do tzv. lehké frakce, ve které se nacházely hlavně prázdné virové kapsidy a jejich refraktometrické indexy se nacházely mezi 1,362 a 1,360.

Složení izolovaných virových částic bylo analyzováno metodou western blot. Analyzována byla také nezávislá izolace provedená Z. Mariničovou (Mariničová, 2017). Vzorky virových částic byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu, po přenosu proteinů na membránu byly detekovány proteiny VP1, VP2 a VP3 specifickými protilátkami. U vzorků divokých i mutovaných forem viru byl detekován monomerní protein VP1 a také jeho izoformy (obrázek 23). Tyto izoformy byly v průměru hojnější u mutovaných forem viru. Při analýze zastoupení minoritních strukturních proteinů v částicích byl zjištěn výrazný rozdíl mezi jednotlivými formami virových částic. Zatímco protein VP2 byl v obou typech částic zastoupen v přibližně stejném množství, ve virových částicích mutovaného viru bylo výrazně zvýšeno množství proteinu VP3 (obrázek 23). Také jsme pozorovali dvojité proužky představující izoformy proteinu VP2. Obdobné zastoupení virových proteinů jsme pozorovali i u druhé nezávislé izolace.

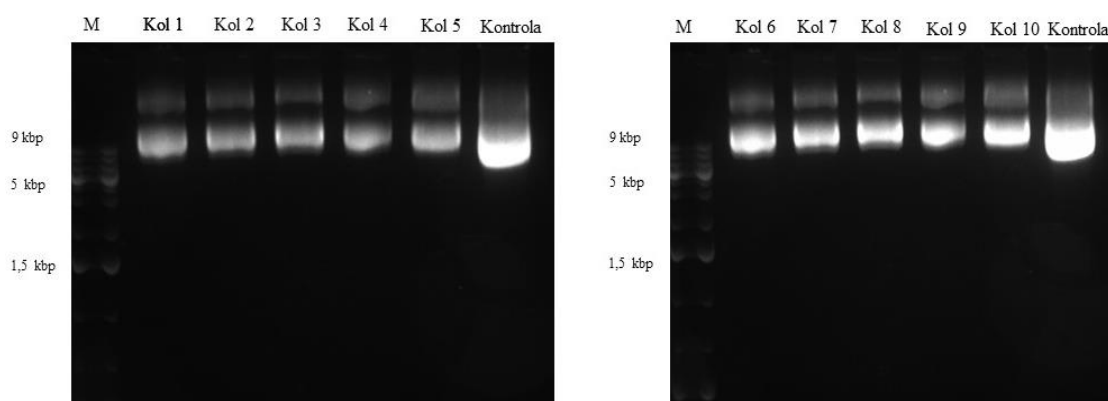


**Obrázek 23: Zastoupení strukturních proteinů ve WT a A117V virových částicích.** Buňky byly transfekovány konstrukty pMJG WT a pMJG A117V, virové částice byly následně izolovány ultracentrifugací přes sacharózový polštář a v gradientu CsCl. Vzorky virových proteinů byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí specifických protilátek proti VP1 a VP2/VP3. Strukturní proteiny myšího polyomaviru se exprimovaly ve všech sledovaných vzorcích. Proužky o velikosti 46 kDa odpovídají VP1 proteinu, 32 kDa odpovídá VP2 proteinu a 25 kDa VP3 proteinu. Výrazný rozdíl byl v zastoupení VP3 a VP2 proteinů ve virové částici mezi WT a A117V typem viru. Zdvojené proužky VP2 proteinu jsou způsobeny posttranslačními modifikacemi VP2 proteinu. Proužky proteinu VP1 u nižší molekulové hmotnosti než 46 kDa jsou pravděpodobně degradovanými formami VP1. Proužky o Mr 52 kDa představují izoformy proteinu VP1. Virové částice označeny 1. izolace byly poskytnuty Z. Mariničovou.(Mariničová 2017).

#### 5.2.4 N' terminální acetylace proteinu VP3 a její vliv na stabilitu strukturních proteinů

N' terminální acetylace má na osud proteinů rozdílný vliv. Může vést k odhalení degradačních signálů, které jsou rozlišovány ubikvitin ligázami. Nebo ke stabilizaci specifických helikálních struktur na N' konci molekuly. Chtěli jsme zjistit, jestli N' koncová acetylace proteinu VP3 má vliv na stabilitu komplexu VP1/VP3. Pro zajištění exprese minoritních proteinů jsme využili plazmid pMJG - Late, nesoucí sekvenci celé pozdní kódující oblasti genomu myšího viru. Tento konstrukt zajišťuje produkci strukturních proteinů v podobných poměrech

jako při expresi virového genomu. Pro zajištění exprese VP3 proteinu, který nebude acetylovaný na svém N' konci, byla do plazmidu pMJG - Late vnesena stejná mutace jako do plazmidu pMJG - A117V. Pro cílenou mutagenezi jsme použili komerční soupravu Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit. Po provedení reakce byla DNA vnesena do bakterií transformací teplotním šokem. Následně jsme izolovali plazmidovou DNA a úspěšnost izolace jsme ověřili elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu. Na elektroforetogramech jsme detekovali pruhy dvou různých velikostí. Produkt o velikosti přibližně 9 kbp odpovídá cirkulárnímu plazmidu, proužek o vyšší velikosti odpovídá OC konformaci stejného plazmidového konstruktu (obrázek 24).



**Obrázek 24:** Plazmid Late byl mutován pomocí komerční soupravy Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, po PCR reakci a transformaci bakterií teplotním šokem byla plazmidová DNA izolována. Výsledek byl ověřen elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu. Na elektroforetogramu je možné pozorovat proužky o velikosti přibližně 9000 párů bazí. Proužek o vyšší velikosti představuje OC konformační stav plazmidu. Značkou M je označen marker, jako kontrola byl použit nemutovaný plazmid pMJG - Late.

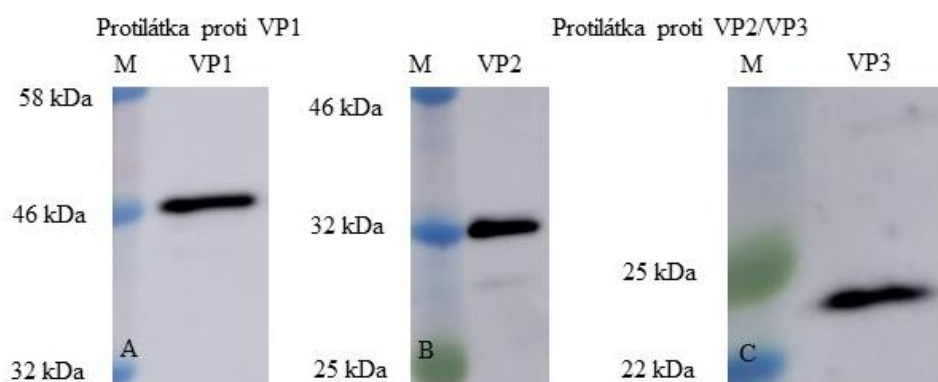
Úspěšnost mutageneze byla ověřena sekvenací. Následně jsme analyzovali zaslaná sekvenční data v programu MEGA X (Mega software). Celkově byly zjištěny 4 kolonie se záměnou alaninu za valin na N' konci proteinu (obrázek 25). Tyto plazmidové konstrukty jsme pojmenovali pMJG - LATE - A117V a použili v dalších experimentech.



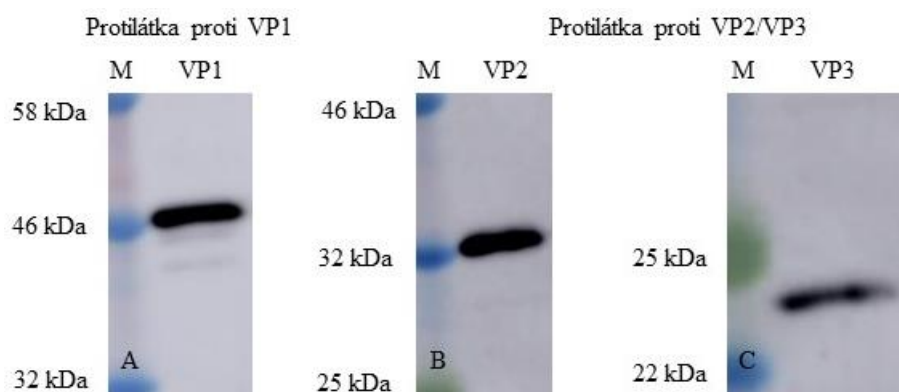
Species/Abbrev	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1. NC_001515.2:c466	M	A	L	I	P	W	R	D	P	A	L	L	D	I	Y	F	P	G	V	N
2. PAD-PAD9	M	A	L	I	P	W	R	D	P	A	L	L	D	I	Y	F	P	G	V	N
3. PAD-PAD9_A11	M	A	L	I	P	W	R	D	P	A	L	L	D	I	Y	F	P	G	V	N
4. PAD-PAD10	M	A	L	I	P	W	R	D	P	A	L	L	D	I	Y	F	P	G	V	N
5. PAD-PAD10_B11	M	A	L	I	P	W	R	D	P	A	L	L	D	I	Y	F	P	G	V	N

**Obrázek 25: Sekvence mutovaného VP/VP3 proteinu.** Sekvenční data byla vyhodnocena v programu Mega X MEGA software. Mutovaná byla N' koncová oblast proteinů VP2/VP3. Cílená byla záměna alaninu za valin tak, aby protein nemohl být acetylován. Celkově se podařilo získat 4 konstrukty u kterých došlo k záměně aminokyseliny. Pro další práci byl vybrán konstrukt č. 10.

Nejprve jsme ověřili, jestli z připraveného konstruktu dochází k expresi strukturních proteinů. Plazmidové konstrukty pMJG - LATE a pMJG - LATE - A117V byly vneseny elektroporací do buněk linie WOP, následně byly buňky lyzovány, připravené vzorky separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a proteiny VP1, VP2 a VP3 byly detekovány specifickými protilátkami. K expresi strukturních proteinů docházelo jak z konstruktů pMJG - LATE, tak i z připraveného konstruktů pMJG - LATE - A117V (obrázek 26 a 27). V obou případech jsme detekovali protein VP1 o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa (obrázek 26 A, 27 A) a minoritní strukturní proteiny VP2 o molekulové hmotnosti 32 kDa (obrázek 26 B, 27 B) a VP3 (obrázek 26 C, 27 C).



**Obrázek 26: Expres strukturních proteinů myšího polyomaviru z konstruktů pMJG - LATE v buňkách WOP.** Buňky byly transfekovány pMJG - LATE a 24 hpt lyzovány. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP1 (A) nebo VP2/VP3 (B, C).

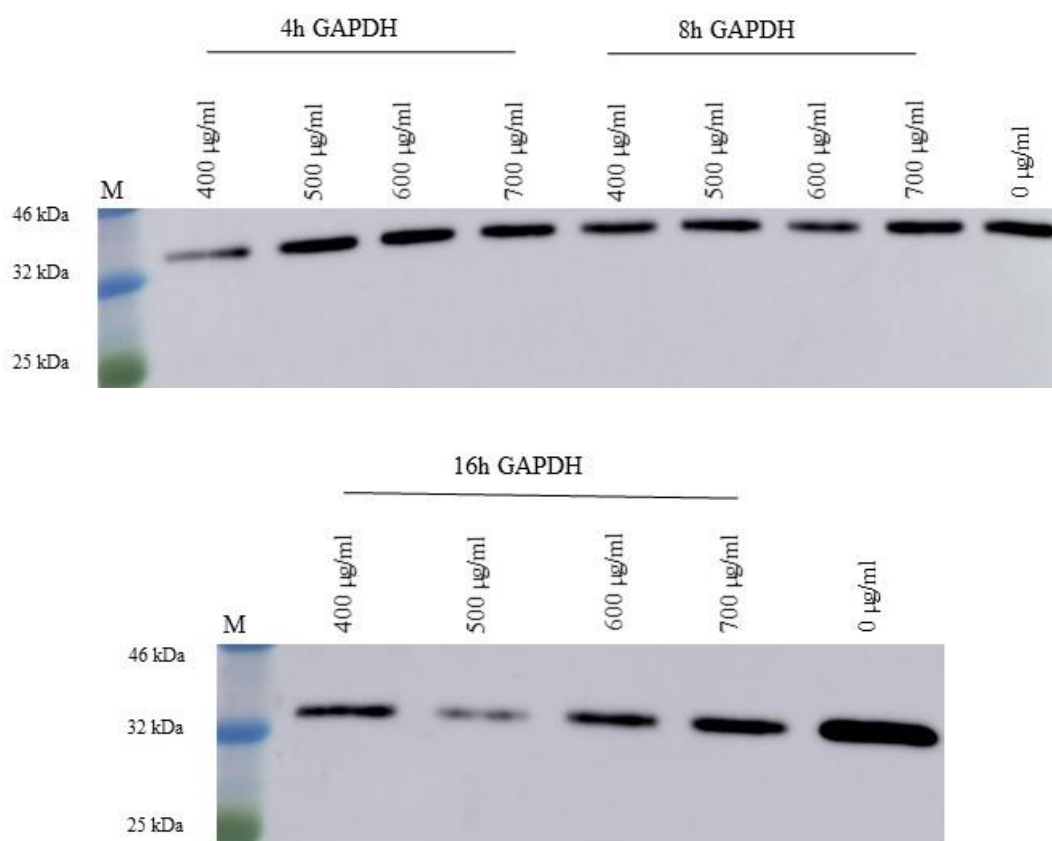


**Obrázek 27: Expres strukturních proteinů myšího polyomaviru z konstruktu pMJG - LATE - A117V v buňkách WOP.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE - A117V a 24 hpt lyzovány. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP1 (A) nebo VP2/VP3 (B, C).

Pro testování stability proteinů jsme se rozhodli použít cyklohexamidovou assay. Principem této metody je to, že antibiotikum cyklohexamid interaguje s ribozomem a dochází k zastavení buněčné proteosyntézy. Podle poklesu množství sledovaných proteinů je možné odvodit jejich stabilitu.

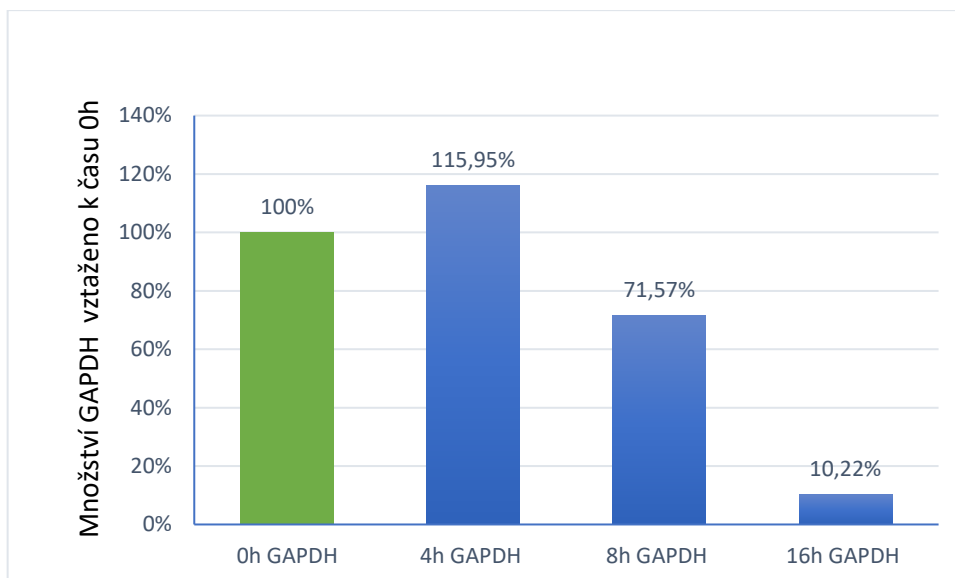
Nejprve bylo potřeba zjistit, jaká koncentrace antibiotika dokáže zastavit buněčnou translaci a není pro buňky vysoce toxická. Při prvním experimentu byla zvolena koncentrace 300 a 400  $\mu\text{g}$  cyklohexemidu na 1 ml média. Buňky s antibiotikem byly inkubovány po dobu 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, a 12 h. Buňky byly lyzovány, lyzáty byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Pro detekci proteinů byla použita protilátka specifická proti GAPDH. Tento protein by měl mít poločas rozpadu přibližně 1 h (Eden *et al.* 2011). Proto jsme tento protein použili pro optimalizaci cyklohexamidové assay. Získané výsledky poukázaly na to, že stále probíhala určitá bazální translace, množství GAPDH výrazně neklesalo ani v době 9 h a 12 h po přidání antibiotika.

Ve druhém experimentu jsme použili větší rozsah koncentrací antibiotika, abychom zjistili, kdy opravdu dochází k zastavení proteosyntézy, aniž by docházelo k výrazné apoptóze buněk. Použili jsme koncentraci 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , přičemž vzorky pro přípravu buněčných lyzátů jsme odebírali po 0 h, 4 h, 8 h a 16 h. Při koncentraci 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nedocházelo, stejně jako v prvním experimentu, k zastavení buněčné proteosyntézy. Koncentrace 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  byla pro buňky toxická (obrázek 28).

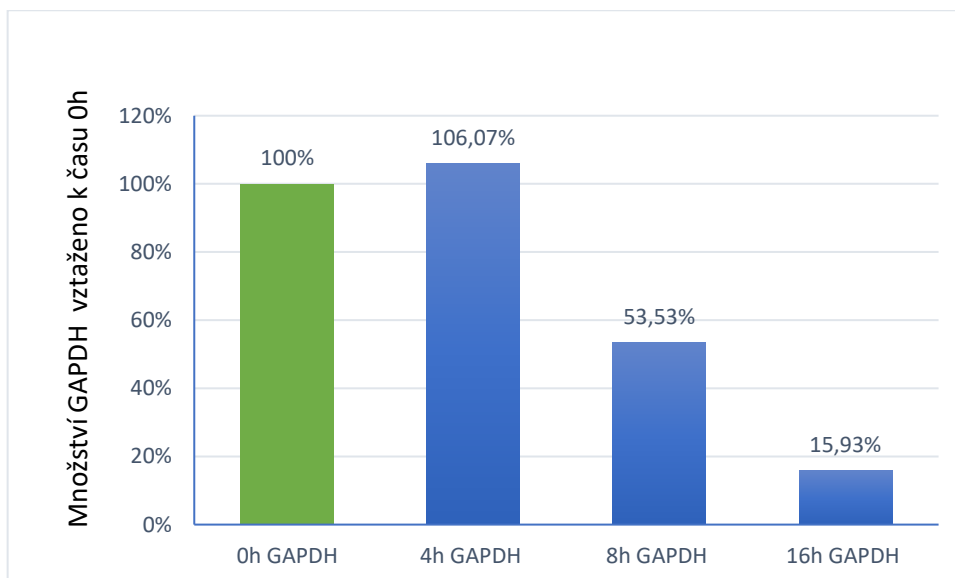


**Obrázek 28: Optimalizace cyklohexamidové assay.** WOP buňky byly inkubovány s cyklohexamidem o koncentracích 400 - 700 µg/ml po dobu 0 h, 4 h, 8 h a 16 h. Po ukončení inkubace byly buňky lyzovány, následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti GAPDH. Ve všech vzorcích byly detekovány proužky GAPDH o relativní molekulové hmotnosti 35 kDa.

Následně jsme analyzovali hodnoty optických denzit jednotlivých vzorků GAPDH v buňkách vystavených 500 µg/ml a 600 µg/ml. V obou případech docházelo k výraznému poklesu množství GAPDH až 6 h po zahájení experimentu (grafy 4 a 5), pokles o 28,43 %, respektive 43,47 %. Na konci experimentu už lyzáty obsahovaly pouze 10,22 % a 15,93 % původního množství GAPDH, avšak v čase 16 h vykazovaly i tyto koncentrace antibiotika vyšší toxicitu. Pro následné analýzy byla zvolena koncentrace 500 µg/ml.

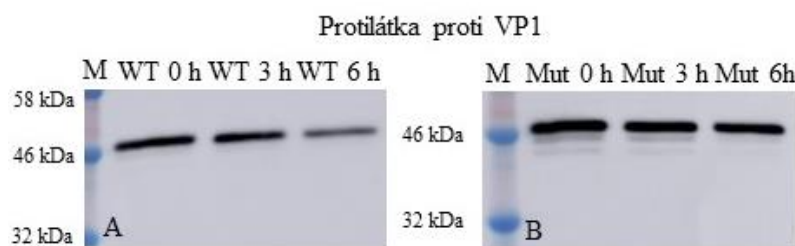


**Graf 4: Stabilita proteinu GAPDH v lyzátu buněk WOP vystavených 500 µg/ml cyklohexemidu.** K WOP buňkám bylo přidáno 500 µg/ml a vzorky byly odebrány na začátku experimentu a následně po 4 h, 8 h a 16 h. Po ukončení inkubace byly buňky lyzovány, následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti GAPDH. Graf znázorňuje množství proteinu GAPDH v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.



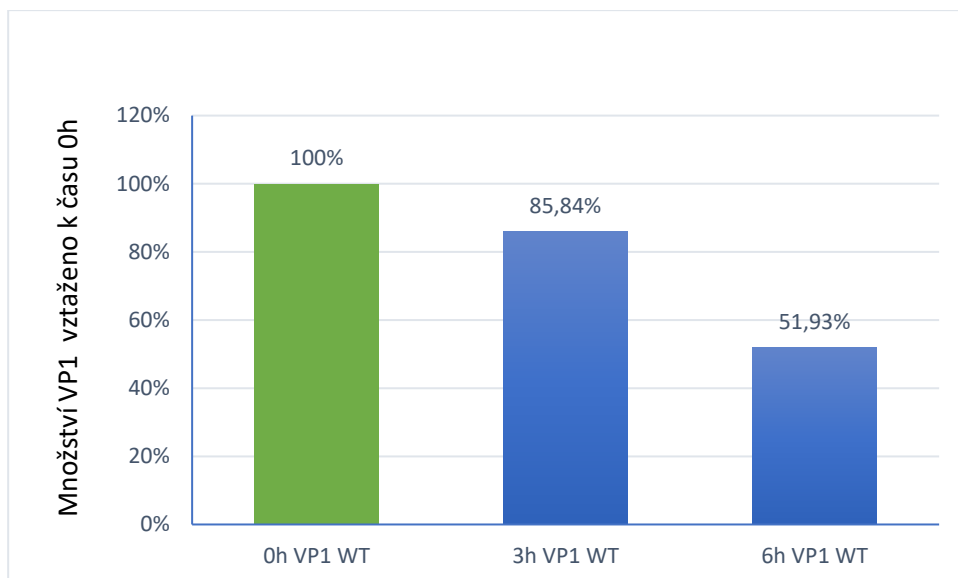
**Graf 5: Stabilita proteinu GAPDH v lyzátu buněk WOP vystavených 600 µg/ml cyklohexemidu.** K WOP buňkám bylo přidáno 600 µg/ml a vzorky byly odebrány na začátku experimentu a následně po 4 h, 8 h a 16 h. Po ukončení inkubace byly buňky lyzovány, následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti GAPDH. Graf znázorňuje množství proteinu GAPDH v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.

Po stanovení optimální koncentrace bylo možné pokračovat na experimentech se strukturními proteiny myšího polyomaviru. Chtěli jsme zjistit, zda námi zjištěné rozdíly v zastoupení minoritních proteinů ve virových částicích divokého a mutovaného typu nemohou být způsobeny nestabilitou těchto proteinů v závislosti na jejich acetylaci. Konstrukty zajišťující expresi strukturních proteinů (pMJG - Late) a mutantní varianty VP3 (pMJG - Late - A117V) byly transfekovány do WOP buněk a po 24 h byl k buňkám přidán cyklohexamid o koncentraci 500 µg/ml. Jednotlivé vzorky byly odebrány po 0 h, 3 h a 6 h. Buňky byly lyzovány, lyzáty byly separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu. Proteiny VP1 a VP3 byly detekovány specifickými protilátkami. Na obrázku 29 je patrný pokles množství proteinu VP1 v lyzátu buněk transfekovaných pMJG - LATE konstruktem. Na obrázku 29 je možné vidět, že množství VP1 v divokém typu vzorku klesá po 6 h od zahájení inkubace. Naproti tomu VP1 ve vzorku A117V je stabilnější.

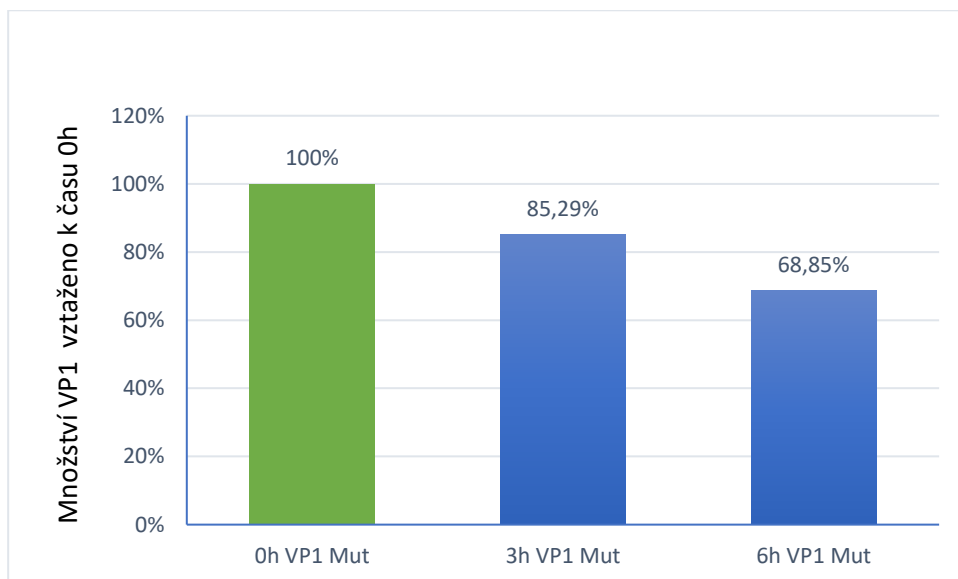


**Obrázek 29: Množství VP1 v buňkách inkubovaných s 500µg/ml cyklohexamidu.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE (WT, membrána A) nebo pMJG - LATE - A117V (Mut, membrána B) a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a vzorky byly odebrány po 0 h, 3 h a 6 h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP1.

Po změření optických densit vzorku jsme zjistili, že VP1 protein obsažený v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE je degradován více než VP1 protein obsažený v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem s mutovanou formou VP3 (pMJG - LATE - A117V) (grafy 6 a 7). VP1 protein obsažený v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE byl degradován už po třech hodinách a jeho množství kleslo po 3 h o 14,16 % a po 6 h inkubaci o 48,07 %, zatímco množství proteinu VP1 v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem s mutovanou formou VP3 pokleslo za stejnou dobu o 14,71 % respektive 31,15 %.

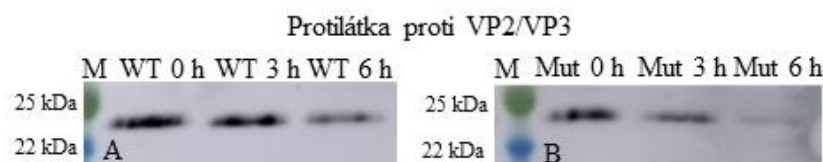


**Graf 6: Stabilita proteinu VP1 v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a lyzáty byly připraveny po 0 h, 3 h a 6h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP1. Graf znázorňuje množství proteinu VP1 v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.



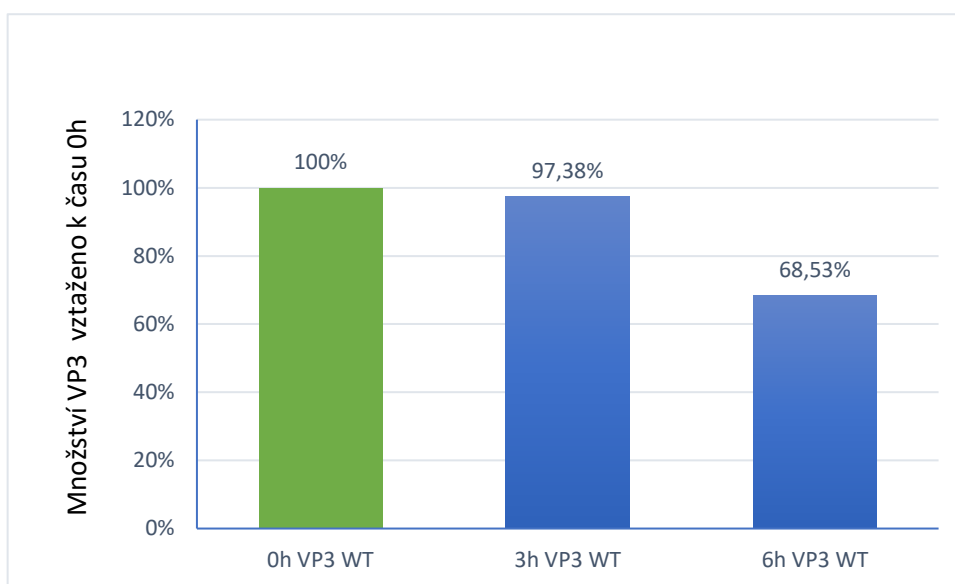
**Graf 7: Stabilita proteinu VP1 v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE - A117V.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE - A117V a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a lyzáty byly připraveny po 0 h, 3 h a 6 h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP1. Graf znázorňuje množství proteinu VP1 v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.

Poté jsme v lyzátech analyzovali také množství VP3 proteinu. Množství VP3 proteinů klesalo v průběhu experimentu v obou typech lyzátů. Rychleji byl ale degradován VP3 protein se záměnou alaninu za valin na svém N' konci (Obrázek 30).

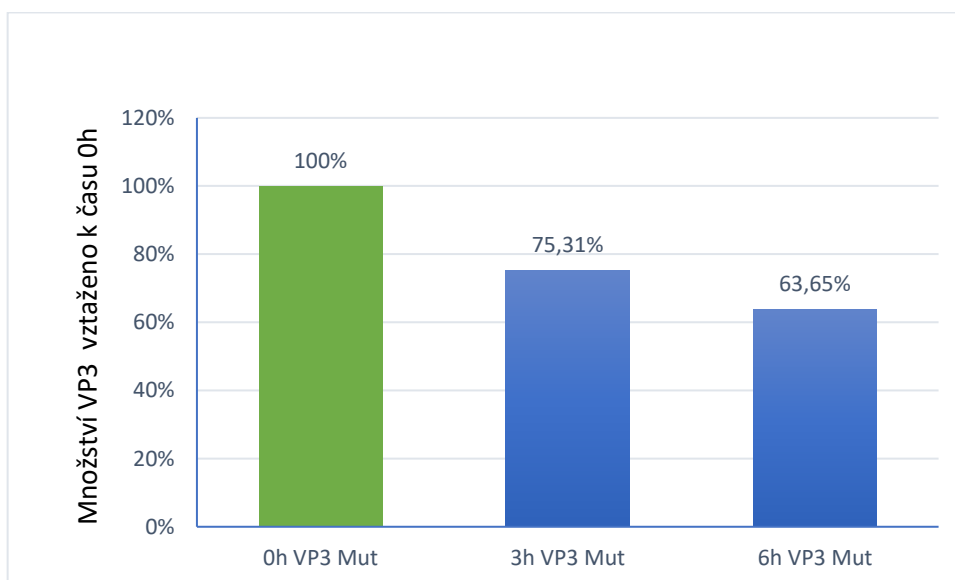


**Obrázek 30: VP3 protein acetylovaný na N' konci je stabilnější než VP3 protein bez této modifikace.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE (WT, membrána A) nebo pMJG - LATE - A117V (Mut, membrána B) a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a vzorky byly odebírány po 0 h, 3 h a 6h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP2/VP3. Ve všech případech docházelo k poklesu množství VP3 proteinu v průběhu experimentu. Mutovaný VP3 protein byl degradován rychleji než divoká forma, a na konci experimentu bylo obtížné tento protein detekovat.

Abychom zjistili, jak rychle dochází k degradaci VP3 proteinu v jednotlivých typech lyzátů, provedli jsme analýzu intenzity chemiluminiscenčních signálů. Překvapivě, data z experimentu naznačují, že VP3 A117V je degradován rychleji než divoký typ proteinu. Množství VP3 A117V kleslo 3 h po zahájení experimentu o 24, 69 % a po šesti hodinách bylo množství proteinu nižší o 36,35 %. Zatímco divoký typ proteinu byl po 3 h stabilní a po 6 h jeho množství kleslo o 31,47 % (grafy 8 a 9).



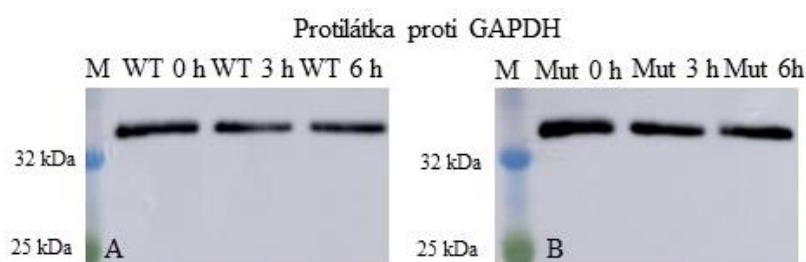
**Graf 8: Stabilita proteinu VP3 v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a lyzáty byly připraveny po 0 h, 3 h a 6h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP2/VP3. Graf znázorňuje množství proteinu VP3 v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.



**Graf 9: Stabilita proteinu VP3 v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE - A117V.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE - A117V a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a lyzáty byly připraveny po 0 h, 3 h a 6h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti VP2/VP3. Graf znázorňuje množství proteinu VP3 v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.

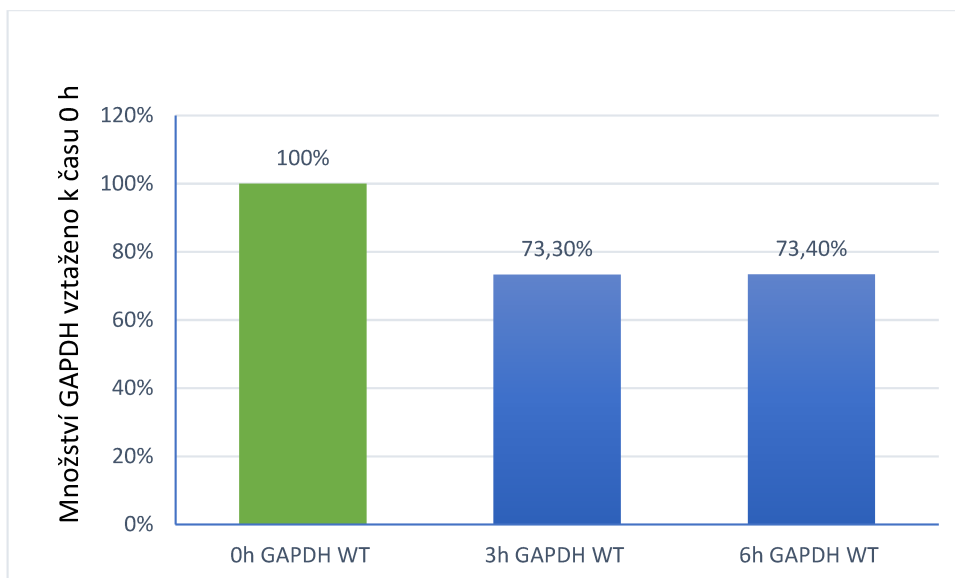


Vzhledem k tomu, že naše data ukazují rozdílnou stabilitu proteinů v lyzátech buněk transfekovaných plazmidy pMJG - Late a pMJG - Late - A117V, chtěli jsme na závěr ukázat, že tento rozdíl je specifický. Proto jsme analyzovali pokles hladiny GAPDH, proteinu, jehož množství by nemělo být ovlivněno mutací proteinu VP3. Na vyobrazené membráně (obrázek 31) jsme detekovali GAPDH pomocí specifické protilátky a sekundární protilátky značené křenovou protilátkou. Proužky odpovídající GAPDH měly relativní molekulovou hmotnost asi 35 kDa a v případě divokých typů vzorků můžeme pozorovat určitý pokles intenzit signálu.

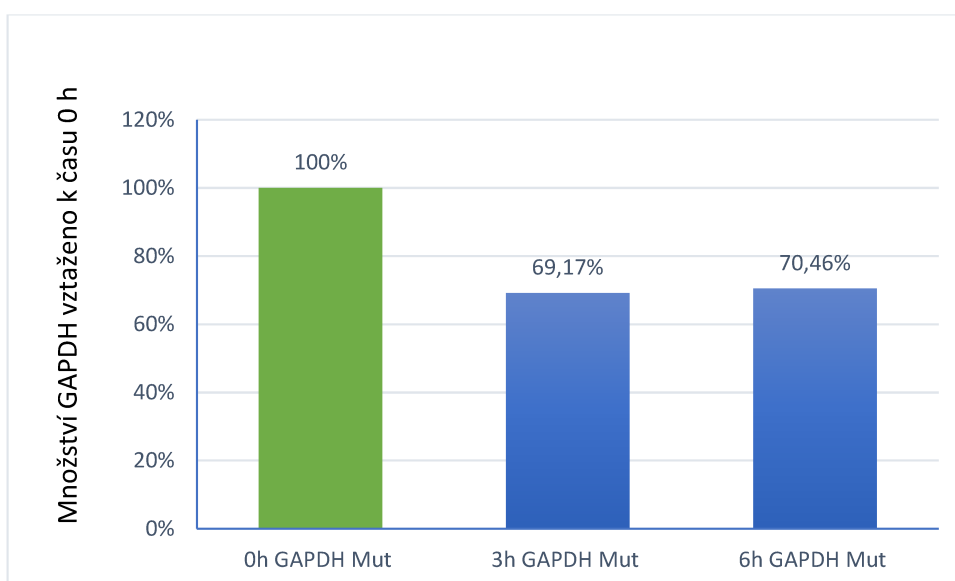


**Obrázek 31: Množství GAPDH v buňkách inkubovaných s 500  $\mu$ g/ml cyklohexamidu.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE (WT, membrána A) nebo pMJG - LATE - A117V (Mut, membrána B) a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500  $\mu$ g/ml cyklohexamidu a vzorky byly odebírány po 0 h, 3 h, 6 h a 9 h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti GAPDH.

Při analýze dat jsme zjistili, že dochází k poklesu množství GAPDH v mutovaných i divokých typech vzorků. K výraznému poklesu GAPDH docházelo u obou typu vzorků už v době 3 h od zahájení experimentu (asi o 27, respektive 30 %). Následně už pokles množství nebyl tak výrazný. Jak naznačují výsledky po 6 h od zahájení experimentu (grafy 10 a 11).



**Graf 10: Stabilita proteinu GAPDH v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a lyzáty byly připraveny po 0 h, 3 h a 6 h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti GAPDH. Graf znázorňuje množství proteinu GAPDH v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.



**Graf 11: Stabilita proteinu GAPDH v lyzátu buněk transfekovaných plazmidem pMJG - LATE - A117V.** Buňky byly transfekovány plazmidem pMJG - LATE - A117V a 24 hpt bylo k buňkám přidáno 500 µg/ml cyklohexamidu a lyzáty byly připraveny po 0 h, 3 h a 6 h inkubaci. Následně byly proteiny separovány v 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu z nitrocelulózy. Proteiny byly detekovány pomocí protilátky specifické proti GAPDH. Graf znázorňuje množství proteinu GAPDH v jednotlivých časových intervalech vztažených na čas 0 h.

Naše data naznačují, že rozdíl ve stabilitě virových proteinů je specifický. Podle získaných dat jsme zjistili, že VP1 protein divokého typu je degradován efektivněji a jeho množství klesá až o 48,07 % původní koncentrace. VP1 protein obsažený v A117V vzorcích byl stabilnější, jeho množství kleslo o 31,15 % původního množství. Rozdíl ve stabilitě obou typů proteinu VP1 se ale projeví až po 6 h od zahájení inkubace. Překvapivě jsme zjistili, že protein VP3 A117V je naopak méně stabilní, než divoký typ proteinu. To podporují také výsledky získané z buněčných lyzátů.

## 6 Diskuze

Posttranslační modifikace jsou úpravy proteinů po jejich nasyntetizování ribozomem. Tyto modifikace dodávají proteinům nové vlastnosti, stabilizují jejich konformace, pomáhají regulovat jejich funkce. Posttranslačně modifikovány jsou i kapsidové proteiny myšího polyomaviru. VP1 protein je cílem celé řady posttranslačních modifikací, byly zjištěny fosforylace, metylace, sulfurylace, hydroxylace a byla popsána i jeho acetylace (Burton *et al.*, 1996; Bolen *et al.*, 1981; Gillock *et al.*, 1997; Ludlow *et al.*, 1989; *et al.*, Li *et al.*, 1995). Význam acetylace VP1 proteinu ale není doposud znám. V řadě případů může mít acetylace dopad na buněčnou lokalizaci proteinů. Často se toto děje u transkripčních faktorů (Soutoglou *et al.*, 2000; Spilianakis *et al.*, 2000). U jiných proteinů, jakým je například tubulin, vede ke stabilizaci jejich polymerních forem a také může ovlivnit jejich mechanické vlastnosti. Acetylace propůjčuje tubulinu vyšší odolnost vůči mechanickému stresu. Reverzibilní acetylace může u některých proteinů vést ke snížení afinity k DNA, a naopak zvyšovat míru fosforylace proteinů, jako je tomu například u transkripčního faktoru Foxo1 (Matsuzaki *et al.*, 2005). Afinita k DNA může být acylací proteinů i zvýšena (Soutoglou *et al.*, 2000). Tato modifikace má vliv také na změnu konformace proteinu, jako je tomu u histonu H3 a acetylace jeho K14, která lokálně ovlivňuje konformaci tohoto proteinu v oblasti peptidové vazby A15 – P16 (Howe *et al.*, 2014). Acetylace není mezi virovými proteiny nijak vzácným jevem. Většinou byly identifikovány acetylace nestrukturních proteinů jako VP40 a VP35 viru Ebola, nebo Tax protein HTLV. Acetylované jsou i strukturní proteiny, například nukleoprotein viru Ebola nebo kapsidové proteiny cytomegaloviru (Hatakeyama *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2018). Avšak význam těchto modifikací obecně není příliš prozkoumán. Naše výsledky poukazují na to, že VP1 protein, který je obsažen ve virových částicích, je acetylován. Acetylace VP1 proteinu je detekovatelná v jeho monomerní formě a dále v proužku o relativní molekulové hmotnosti přibližně 52 kDa, tuto formu jsme označili jako hyperacetylovanou formu VP1. V hrubém virovém izolátu jsme detekovali méně acetylovaných forem VP1 než ve virovém izolátu přečištěném v gradientu CsCl. V hrubém virovém izolátu, který obsahuje kromě virových částic také velké množství pentamer proteinu VP1 a částic poškozených, se prakticky nevyskytovala hyperacetylovaná forma proteinu VP1. Zůstává tedy otázkou, jestli je tato forma specifická pro virové částice.

Fosforylace VP1 proteinu je příkladem posttranslační modifikace, na které se podílejí také minoritní proteiny (Lie *et al.*, 1995). V případě acetylace jsme tedy chtěli vědět, zda mají minoritní proteiny vliv na vznik a míru této modifikace u VP1 proteinu. Předpokládali jsme, že by minoritní proteiny mohly indukovat konformační změny VP1 pentameru anebo by mohlo docházet k lepší vazbě proteinů zapojených přímo do acetylace VP1. Pro zodpovězení těchto otázek jsme analyzovali míru acetylace proteinu VP1 u VLPs částic složených z různých strukturních proteinů (VP1, VP1/EGFP-tVP3, VP1/VP2, VP1/VP3). VP1/EGFP-tVP3 částice byly použity právě pro ověření, zda je pro efektivní acetylaci dostatečná interakce s částí minoritního proteinu, která je zodpovědná za vazbu do vnitřního prostoru pentameru. Celý fúzní protein EGFP-tVP3 zhruba odpovídá velikosti VP2 proteinu (Bouřa *et al.*, 2005). Ukázali jsme, že přítomnost minoritního proteinu je velmi důležitá pro úspěšné provedení této posttranslační modifikace. VLPs částice složené pouze z VP1 proteinu byly acetylované nejméně ze všech testovaných. Monomerní forma proteinu VP1 byla nejvíce acetylována v částicích složených z VP1/VP2 a VP1/VP3. Tyto výsledky naznačují, že pro vysokou efektivitu acetylace VP1 je potřeba vazby celého minoritního proteinu. U hyperacetylované formy byla situace odlišná. Nejvíce byla tato forma zastoupena u částic VP1/EGFP-tVP3, což podporuje nutnost konformační změny po navázání minoritního proteinu. Je tedy možné, že v případě acetylace se může jednat o kombinaci výraznější konformační změny a následné vazby acetylačních enzymů. Podobná situace byla pozorována i při studiu fosforylace proteinu VP1. Při ko - expresi s minoritními proteiny byl VP1 kromě vyšší míry fosforylace také odlišně rozlišován specifickými protilátkami. Tato data naznačovala spíše význam konformačních změn proteinu VP1 pro jeho efektivní fosforylaci (Lie *et al.*, 1995).

HDAC6 je jedna z cytoplazmatických deacetyláz (Hubbert *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2003). HDAC6 má obecně v buňce celou řadu úloh, zasahuje do procesu autofágie, pohyblivosti buněk, vrozené imunity a proliferace. HDAC6 hraje významnou úlohu i v replikačních cyklech některých virů. Například v buňkách infikovaných IAV dochází k degradaci HDAC6 od jejího C' konce. Naopak, infekce hostitelských buněk virem HIV vede ke zvýšení množství tohoto enzymu (Husain *et al.*, 2010, Wenzel *et al.*, 2019). Naše výsledky naznačují, že VP1 protein je dalším ze zástupců substrátů tohoto buněčného enzymu. Ve virionech izolovaných z buněk s aktivní HDAC6 a HDAC6 KO buněk byl monomerní VP1 acetylovaný zhruba ve stejné míře, ale v částicích izolovaných z HDAC6 KO buněk jsme detekovali mnohem více hyperacetylované formy proteinu

VP1. Otázkou je, jaký vliv má výraznější zastoupení této izoformy na morfogenezi a infektivitu viru. Je pravděpodobné, že nepřítomnost HDAC6 a tím pádem i zvýšená míra acetylace VP1 má negativní vliv na množství částic. To, že se v HDAC6 KO buňkách tvoří méně virového potomstva nepřímo naznačují výsledky kvantifikace množství virových genomů a snímky z elektronového mikroskopu. Množství částic obsažených v izolátu z HDAC6 KO buněk bylo výrazně menší ve srovnání s izolátem z rodičovské buněčné linie. Podobný trend byl už dříve pozorován na příkladu fosforylace virového VP1 proteinu. Virové izoláty, které tvoří virové částice s nižší efektivitou neobsahují tak fosforylované VP1 proteiny (Garcea *et al.*, 1985).

Má HDAC6 nějaký vliv i na infektivitu myšího polyomaviru? Některé viry regulují aktivitu a množství enzymu HDAC6, což naznačuje, že by opravdu mohla mít vliv na průběh replikačního cyklu. Virus izolovaný z HDAC6 KO buněk byl oproti viru izolovanému z rodičovské linie výrazně méně infekční. Acetylace má vliv na buněčnou lokalizaci proteinu a jejich schopnost vázat DNA, konformaci a stabilitu proteinů. Je otázkou, která z těchto vlastností může ovlivnit infektivitu a tvorbu částic. Acetylace proteinů dokáže snižovat schopnost vázat DNA, která je důležitá pro proteiny jako je Foxo1 (Matsuzaki *et al.*, 2005). Je možné, že VP1 protein, který je acetylován hostitelským enzymatickým aparátem následně v HDAC6 KO buňkách nemůže být deacetylován nebo alespoň ne tak efektivně. Protein VP1 pak může špatně vázat virovou DNA nebo interagovat s ostatními VP1 pentamery, což by vedlo k nižší tvorbě částic, zároveň zvýšená acetylace může vést k nestandardním interakcím proteinu VP1 s buněčnými proteiny a může tak ovlivnit infektivitu. Acetylace na C' konci Stat3 na lyzinu 685 posiluje tvorbu dimeru (Yuan *et al.* 2005). Obdobně acetylace  $\beta$  kateninu na lyzinu 345 zvyšuje afinitu tohoto proteinu k vazbě Tcf4. Na druhou stranu acetylace  $\beta$  kateninu snižuje jeho vazbu k adrogennímu receptoru (Lévy *et al.*, 2004). Bromodoména PCAF specificky rozlišuje Tat acetylovaný na lyzinu 50 (Mujtaba *et al.*, 2002). Jsou zde ale i opačné dopady acetylace, které brání protein – proteinovým interakcím. Acetylace na RelA podjednotce proteinu NF -  $\kappa$ B prakticky úplně zabraňuje vazbě I $\kappa$ B $\alpha$  (Chen *et al.*, 2001). To, že zvýšená acetylace proteinu VP1 má negativní vliv na infektivitu viru MPyV, podporuje i pozorování, že inhibice HDAC6 tubacinem vedla k tvorbě vyššího množství proteinu VP1, ale virus izolovaný z buněk inkubovaných s tubacinem byl méně infekční, než virus izolovaný z buněk kontrolních (Horníková *et al.*, 2020).

Z našich dalších výsledků plyne, že ani nadprodukce HDAC6 není pro replikaci

viru výhodná, pravděpodobně z pohledu syntézy VP1 proteinu. Naše výsledky naznačují, že buňky, které nadprodukovaly HDAC6, jsou byly o 72 % méně infikovány myším polyomavirem ve srovnání s kontrolními buňkami. V kontextu nižší infekitivity viru produkovaného v HDAC6 KO buňkách je to poměrně zajímavý výsledek. Je možné, že virus vyžaduje přesně regulovanou míru acetylce VP1 proteinu a ani jedna z krajních možností (příliš acetylované proteiny nebo příliš velká aktivita HDAC6) není pro replikaci viru výhodná. Druhá možnost vychází z detekce proteinů při infekci myším polyomavirem. Při analýze infekitivity viru izolovaného z HDAC6 KO buněk jsme detekovali LT antigen v jádře infikovaných buněk, v druhém experimentu s buňkami nadprodukujícími HDAC6 jsme detekovali VP1 protein myšího polyomaviru. Je tedy také možné, že pro efektivní replikaci myšího polyomaviru je v časně fázi jeho infekce potřeba spíše neacetylovaných proteinů utvářejících virové částice. Acetylce tubulinu vede k jeho vyšší odolnosti vůči mechanickému stresu (Xu *et al.*, 2017, Portran *et al.*, 2017, Eshun *et al.*, 2019). Otázkou je, zda částice se silně acetylovaným VP1 proteinem, nejsou příliš rigidní a zda by tato skutečnost nevedla k interakcím s buněčnými faktory a při rozvolňování viru cestou do buněčného jádra. Na druhou stranu v pozdní fázi infekce může přílišná aktivita HDAC6 být také na škodu. Je známo, že acetylce ovlivňuje tvorbu protein – proteinových komplexů a vazebnou afinitu proteinů k molekule DNA. Je otázkou, zda se tvoří dostatek částic virového potomstva, jestli neacetylovaný VP1 protein dokáže efektivně vázat DNA a jestli jsou vytvořené částice dostatečně stabilní, aby byly schopné opuštění buňky a reinfekce.

Acetylaci mohou být také modifikovány proteiny na svém N' konci. N' koncovou acetylaci vykazuje také protein VP3. Jak se členům naší laboratoře podařilo zjistit již dříve, virové, částice jejichž VP3 protein není acetylován na svém N' konci (virus A117V), nejsou infekční. Protože jednou z možných příčin poklesu infekitivity je i nepřítomnost minoritního proteinu v částici (Mannová *et al.*, 2002b), rozhodli jsme se analyzovat zastoupení minoritních proteinů v divoké formě viru a ve viru A117V. Připravili jsme lyzáty buněk transfekovaných genomy divokého typu viru (WT) a virové mutanty (A117V). V lyzátu z buněk transfekovaných genomy WT viru byl ze dvou minoritních proteinů výrazně více zastoupen VP3. Překvapivě více VP2 proteinu bylo obsaženo v lyzátech z buněk transfekovaných genomy viru A117V. Zajímavá situace ovšem nastává po sestavení virových částic. Zde se poměr zastoupení minoritních proteinů obrací. Při analýze virových částic divokého typu jsme zjistili, že VP2 protein je zastoupen výrazně více ve srovnání s VP3 proteinem. Po analyzování vzorků A117V

virových částic jsme zjistili, že množství VP3 proteinu je vyšší, ale množství VP2 v částicích je prakticky stejné jako u WT viru. Virová částice myšího polyomaviru je vystavena ze 72 kapsomer. Tyto kapsomery jsou propojeny flexibilním C' koncovým ramenem VP1 proteinu. V kapsomerách jsou vytvořeny prohlubně, do kterých se váží minoritní strukturní proteiny. Virová částice myšího polyomaviru je tvořena kromě 360 jednotek VP1 proteinu také 72 proteiny minoritními. Do každé kapsomery se v modelovém případě váže jeden minoritní protein VP2 nebo VP3 (Chen *et al.*, 1998; Stehle *et al.*, 1997). Některé studie ale naznačují, že se by se do virové kapsidy mohlo minoritních proteinů vtěsnat více. Do každého pentameru by se v takovém případě vázaly 2 minoritní proteiny (Schowalter *et al.*, 2013). Je tedy otázkou, zda není infektivita těchto virových částic narušena tím, že je v kapsidě „zabaleno“ příliš velké množství minoritních proteinů. A zda výrazný nadbytek minoritních proteinů nevede ke změnám struktury částice nebo neovlivňuje dopravu genomu do jádra. Minoritní proteiny mají afinitu k membránám a jsou nepostradatelné pro translokaci virového genomu z ER do cytozolu. Je tedy možné, že nadbytek minoritních proteinů v částici vede k předčasnému uvolnění virové částice z endozomů (např. lysozomu) a tím pádem k neproduktivní infekci.

N' terminální acetylace je významnou modifikací, která ovlivňuje stabilitu proteinů. Acetylace N' koncové oblasti může vést k vytvoření degradačního signálu. Děje se tak hlavně v případě, když je acetylovaný degradační signál vystaven a přístupný pro buněčné faktory, jakými jsou ubikvitin ligázy (Hwang *et al.*, 2010). Takto acetylované proteiny jsou snáze rozlišovány ubikvitin ligázami a proteiny jsou degradovány v proteazomu. Rgs2 protein je rychleji degradován, pokud je acetylován na svém N' konci, k degradaci neacetylovaných forem dochází až později (Park *et al.* 2015). Avšak data získaná při studiu stability proteinu VP3 naznačují, že mutovaný (neacetylovaný) VP3 protein je degradován rychleji než jeho divoká forma. Tato data naznačují, že acetylace VP3 proteinu vede spíše k tomu, že je degradační signál maskován. U ubikvitin ligáz se vyskytují N' terminální acetylované degrony. Hcn1 (podjednotka APC/C ubikvitin ligázy) obsahuje degron, který může být maskován prostřednictvím Cut9 (ligand Hcn1). Obdobná situace se vyskytuje u Cog1 (podjednotka COG komplexu asociovaného s Golgi). Degradací signál Cog1 je opět maskován jeho ligandy (Cog2 a Cog3) (Shemorry *et al.* 2013). Navíc, acetylace nemusí vést pouze k degradaci proteinů. Dokáže stabilizovat konformaci N' terminální oblasti proteinů. Neacetylovaný N' terminální peptid (32 AA) není příliš helikální. Helicita peptidu se zvyšuje s jeho



acetylací (Greenfield *et. al* 1994). Obdobný vliv má přítomnost N' terminální acetylce u  $\alpha$  sinucleinu, jeho acetylovaná forma si zachovává vysokou míru helicity a dokáže lépe interagovat s micelami lipidickými i lipidickými detergenty (Maltsev *et al.*, 2012; Dikiy *et al.*, 2014). N' koncová acetylce by tak mohla ovlivňovat interakci proteinu VP3 s buněčnými membránami. Pokud shrneme naše výsledky, je možné pozorovat, že protein VP3 je chráněn před degradací dvěma způsoby. Acetylovaný VP3 je chráněn před degradací, zároveň je také pravděpodobně VP3 protein po vazbě do kapsomery virové částice chráněn před ubiquitin ligázami. Pokud ale VP3 A117V není chráněn virovou částicí, je ubiquitin ligázami rozlišován dobře a efektivně degradován. Zároveň N' koncová acetylce může také ovlivňovat interakci s pentametrem, popřípadě podporovat vznik homodimerů proteinu VP3. Ty by se mohli vázat do dutiny pentameru, a tím pádem i zvyšovat množství VP3 proteinu v mutovaných virových částicích. Vzhledem k tomu, že v pozdních časech odběru vzorků množství VP3 proteinu divokého a mutovaného typu klesá podobně, nabízí se druhá možnost dopadu N' terminální acetylce. Při zkoumání proteinu sinuclein bylo zjištěno, že acetylce jeho N' koncové oblasti dokáže navozovat tvorbu helikálních struktur, které jsou důležité pro interakci s membránovými strukturami. Minoritní proteiny myšího polyomaviru obsahují hydrofobní domény a vykazují viroporinové aktivity (Huerfano *et al.*, 2010, Giorda *et al.*, 2013). Jejich stabilizace acetylací by mohla být pro infektivitu neméně důležitá. To, jaký přesný význam má pro infektivitu myšího polyomaviru N koncová acetylce proteinu VP3, jestli je tato modifikace důležitá pro zachování afinity VP3 proteinu k buněčným membránám nebo jakým mechanismem dochází k vyššímu zastoupení VP3 proteinu ve virových částicích by mělo být předmětem dalšího výzkumu.

## 7 Závěr

Výsledky představené v této diplomové práci můžeme shrnout do několika následujících bodů.

**Prvním cílem této práce bylo ověřit, zda je VP1 protein myšího polyomaviru acetylován ve virové částici, jak se na procesu acetylaci VP1 podílejí minoritní strukturní proteiny a zda se na acetylačním stavu VP1 a replikačním cyklu myšího polyomaviru podílí HDAC6.**

- Prokázali jsme, že protein VP1 je acetylován a že je součástí infekční virové částice.
- Naše výsledky naznačují, že minoritní proteiny jsou potřebné pro acetylaci majoritního strukturního proteinu myšího polyomaviru.
- Izolovali jsme virus z buněk s delecí genu pro buněčnou deacetylázu, HDAC6. VP1 protein tohoto viru byl více acetylován než VP1 protein izolovaný z buněk endogenně exprimující HDAC6. Zároveň zvýšená acetylaci proteinu VP1 měla negativní vliv na jeho infektivitu.
- Připravili jsme plazmidový konstrukt umožňující expresi lidské HDAC6. Nadprodukce HDAC6 v buňkách má negativní vliv na infektivitu myšího polyomaviru.

**Druhým cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že virus A117V (virus s proteinem VP3, který není schopen N' koncové acetylaci) je neinfekční díky snížené stabilitě proteinu VP3.**

- Připravili jsme lyzáty buněk transfekovaných ligovanými genomy viru pMJG A117A a pMJG WT. Izolovali jsme virové částice viru divokého typu a mutantního viru A117V.
- Porovnali jsme zastoupení minoritních proteinů jak v lyzátech transfekovaných buněk, tak v izolovaných částicích. Zatímco v lyzátu buněk transfekovaných genomy mutantního viru A117V bylo detekováno více proteinu VP2 než

VP3, v lyzátu buněk transfekovaných genomy viru divokého typu bylo detekováno více proteinu VP3 než VP2. Ve virových částicích byla situace opačná. I když množství proteinu VP2 bylo v obou typech částic srovnatelné, v částicích viru A117V bylo zastoupení proteinu VP3 výrazně vyšší než v částicích viru divokého typu.

- Pro studium stability byla optimalizována metoda cyklohexamidová assay. Tato metoda byla použita pro určení stability VP3 proteinu neschopného N' koncové acetylce. Námi získaná data naznačují, že VP3 protein neschopný N' koncové acetylce je méně stabilní než jeho acetylovaná forma.

## 8 Seznam použité literatury

- Adamec, T., Palkova, Z., Velkova, K., Stokrova, J., Forstova, J., (2005).** Point mutation in calcium-binding domain of mouse polyomavirus VP1 protein does not prevent virus-like particle formation, but changes VP1 interactions with cell structures. *FEMS Yeast Research*. 5 (4-5), pp. 331-340.
- Aksnes, H., Ree, R., Arnesen, T., (2019).** Co-translational, Post-translational, and Non-catalytic Roles of N-Terminal Acetyltransferases. *Molecular Cell*. 73(6), pp. 1097-1114.
- Arnesen, T., Van Damme, P., Polevoda, B., Helsens, K., Evjenth, R., Colaert, N., Varhaug, J., E., Vandekerckhove, J., Lillehaug J., R., Sherman, F., Gevaert, K., (2009).** Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(20), pp. 8157-8162.
- Barouch, D., H., Harrison, S., C., (1994).** Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology*. 68(6), pp. 3982-3989.
- Bertos, N., Gilquin, B., Chan, G., Yen, T., J., Khochbin, S., Yang, X., J., (2004).** Role of the Tetradecapeptide Repeat Domain of Human Histone Deacetylase 6 in Cytoplasmic Retention. *Journal of Biological Chemistry*. 279(46), pp. 48246-48254.
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., Garcea, R., L., (2008).** Possible Role for Cellular Karyopherins in Regulating Polyomavirus and Papillomavirus Capsid Assembly. *Journal of Virology*. 82(20), pp. 9848-9857.
- Bitler B., G., Wu, S., Park, P., H., Hai, Y., Aird K., M., Wang, Y., Zhai, Y., Kossenkova, A., V., Varaiya, A., Rauscher III, F., J., Zou, W., Speicher, D., W., Huntsman, D., G., Conejo-Garcia, J., R., Cho, K., R., Christianson, D., W., Zhang, R., (2017).** ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity. *Nature Cell Biology*. 19(8), pp. 962-973.
- Bolen, J. B., Anders, D. G., Trempey, J., Consigli R. A., (1981)** Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *Journal of Virology*. 37 (1), pp. 80-91.
- Borchert, S., Czech-Sioli, M., Neumann, F., Schmidt, C., Wimmer, P., Dobner, T., Grundhoff, A., Fischer, N., (2014).** High-Affinity Rb Binding, p53 Inhibition, Subcellular Localization, and Transformation by Wild-Type or Tumor-Derived Shortened Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigens. *Journal of Virology*. 88(6), pp. 3144-3160
- Boura, E., Liebl, D., Spísek, R., Fric, J., Marek, M., Stokrová, J., Holán, V., Forstová, J., (2005).** Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters*. 579(29), pp. 6549-6558.
- Brady J., N., Winston V., D., Consigli, R., A., (1977).** Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *Journal of Virology*. 23(3), pp. 717-724.
- Burton, K. S., Consigli, R. A., (1996)** Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Research*. 40 (2), pp. 141-147.
- Buck, C., B., VanDoorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E., M., Tisza, M., J., An, P., Katz, J., P., Pipas, J., M., McBride, A., A., Camus, A., C., McDermott, A., J., Dill, J., A., Delwart, E., Ng, T., F., F., F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D., V., Varsani, A., (2016).** The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathogens*. 2016, 12(4), e1005574.
- Bu, B., Tong, X., Li, D., Hu, Y., He, W., Zhao, C., Hu, R., Li, X., Shao, Y., Liu, C., Zhao, Q., Ji, B., Diao, J., (2017).** N-Terminal Acetylation Preserves  $\alpha$ -Synuclein from Oligomerization by Blocking Intermolecular Hydrogen Bonds. *ACS Chemical Neuroscience*. 8(10), pp. 2145-2151.

**Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M., C., W., Daugherty, M., D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., (2016).** A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*. **161**(6), pp. 1739-1750.

**Carmichael, G., G., (2016).** Gene Regulation and Quality Control in Murine Polyomavirus Infection. *Viruses*, **8**(10). *The EMBO Journal*. **17**(12): 3233–3240.

**Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M., I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., Giacca, M., (2005).** Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *The EMBO Journal*. **24**(17), pp. 3070-3081.

**Campbell, K., S., Auger, K., R., Hemmings, B., A., Roberts, T., M., Pallas D., C., (1995).** Identification of regions in polyomavirus middle T and small t antigens important for association with protein phosphatase 2A. *Journal of virology*. **69**(6), pp. 3721-3728.

**Carbone, M., Reale, A., Di Sauro, A., Sthandier, O., Garcia, M., Maione, R., Caiafa, P., Amati, P., (2006).** PARP-1 Interaction with VP1 Capsid Protein Regulates Polyomavirus Early Gene Expression. *Journal of Molecular Biology*. **363**(4), pp. 773-785.

**Chang, D., Haynes J., I., Brady, J., N., Consigli, R., A., (1992).** Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology*. **191**(2), pp. 978-983.

**Chang, D., Haynes, J., I., Jr, Brady, J., N., Consigli, R., A., (1993).** Identification of Amino Acid Sequences in the Polyomavirus Capsid Proteins That Serve as Nuclear Localization Signals. *Transactions of the Kansas Academy of Science*. **96**(1/2), pp. 35-9.

**Chen, X., S., Stehle, T., Harrison S., C., (1998).** Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *The EMBO Journal*. **17**(12). pp. 3233-3240.

**Chen L., f., Fischle, W., Verdin, E., Greene, W., C., (2001).** Duration of Nuclear NF-kappa B Action Regulated by Reversible Acetylation. *Science*. **293**(5535), pp. 1653-1657.

**Chen, L., Wang, X., Fluck, M., M., (2006).** Independent Contributions of Polyomavirus Middle T and Small T to the Regulation of Early and Late Gene Expression and DNA Replication. *Journal of Virology*. **80**(15), 7295-7307.

**Chen, P., L., Hsu, P., H., Fang, C., Y., Chang, C., F., Ou W., C., Wang, M., Chang, D., (2011).** Phosphorylation of Ser-80 of VP1 and Ser-254 of VP2 is essential for human BK virus propagation in tissue culture. *Journal of General Virology*. **92**(11), pp. 2637-2645.

**Choi, S., J., Lee, H., C., Kim, J., H., Park, S., Y., Kim T., H., Lee, W., K., Jang, D., J., Yoon, J., E., Choi, Y., I., Kim, S., Ma, J., Kim, C., J., Yao, T., P., Jung, J., U., Lee, J., Y., Lee, J., S., (2016).** HDAC 6 regulates cellular viral RNA sensing by deacetylation of RIG-I. *The EMBO Journal*. **35**(4), pp. 429-442.

**Cripe, T., P., Delos, S., E., Estes, P., A., Garcea, R., L., (1995).** In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *Journal of virology*. 1995, **69**(12), pp. 7807-7813.

**Chromy, L., R., Pipas, J., M., Garcea, R., L., (2003).** Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(18), pp. 10477-10482.

**Chromy, L., R., Oltman, A., Estes, P., A., Garcea, R., L., (2006).** Chaperone-Mediated In Vitro Disassembly of Polyoma- and Papillomaviruses. *Journal of Virology*. **80**(10), pp. 5086-5091.

**Cloutier, P., Coulombe, B., (2013):** Regulation of molecular chaperones through post-translational modifications: Decrypting the chaperone code. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. **1829**(5), pp. 443-454.

**Daniels, R., Rusan, N., M., Wadsworth, P., Hebert, D., N., (2006).** SV40 VP2 and VP3 Insertion into ER Membranes Is Controlled by the Capsid Protein VP1: Implications for DNA Translocation out of the ER. *Molecular Cell*. **24**(6), pp. 955-966.

**Delos, S., E., Cripe, T., P., Leavitt, A., D., Greisman, H., Garcea R., L., (1995).** Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *Journal of virology*. **69**(12), pp. 7734-7742.

**Dikiy, I., Eliezer, D., (2014).** N-terminal Acetylation Stabilizes N-terminal Helicity in Lipid-and Micelle-bound  $\alpha$ -Synuclein and Increases Its Affinity for Physiological Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(6), pp. 3652-3665.

**Drazic, A., Myklebust, L., M., Ree, R., Arnesen, T., (2016).** The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1864**(10), pp. 1372-1401.

**Ehlers, B., Anoh, A., E., Salem, N., B., Broll, S., Couacy-Hymann, E., Fischer, D., Gedvilaite, A., Ingenhütt, N., Liebmann, S., Martin, M., Mossoun, A., Mugisha, L., Muyembe-Tamfum, J. J., Pauly, M., deVal, B., P., Preugschas, H., Richter, D., Schubert, G., Szentiks, C., A., Teichmann, T., Walter, C., Ulrich, R., G., Wiersma, L., Leendertz, F., H., Calvignac-Spencer, S., (2019).** Novel Polyomaviruses in Mammals from Multiple Orders and Reassessment of Polyomavirus Evolution and Taxonomy. *Viruses*. **11**(10).

**Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M.V., Toso, D., B., Löhr, T., Vendruscolo, M., Bonomi, M., Fraser, J., S., Nogales, E., (2019).** Effects of  $\alpha$ -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **116**(21), pp. 10366-10371.

**Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A., J., Dilworth, S., M., Beard, S., Griffin, B., E., (1993).** Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology*. **67**(3), pp. 1405-1413.

**Gao Y., S., Hubbert C., C., Yao T., P., (2010).** The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(15), pp. 11219-11226

**Garcea, R., L., Ballmer-Hofer, K., Benjamin, L., (1985).** Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *Journal of Virology*. **54**(2), pp. 311-316.

**Garcia, M-I., Perez, M., Caruso, M., Sthandier, O., Ferreira, R., Cermola, M., Macchia, C., Amati, P., (2000).** A Mutation in the DE Loop of the VP1 Protein That Prevents Polyomavirus Transcription and Replication. *Virology*. **272**(2), pp. 293-301.

**Gilbert, J., Dahl, J., Riney, C., Cui, J., Y., C., Holmes, R., Lencer, W., Benjamin, T., (2005).** Ganglioside GD1a Restores Infectibility to Mouse Cells Lacking Functional Receptors for Polyomavirus. *Journal of Virology*. **79**(1), 615-618.

**Gillock, E., T., Rottinghaus S., T., Chang, D., Cai, X., Smiley S., A., An, K., Consigli, R., A., (1997).** Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *Journal of virology*. **71**(4), pp. 2857-2865.

**Giorda, K., M., Raghava, S., Zhang, M., W., Hebert D., N., (2013).** The Viroporin Activity of the Minor Structural Proteins VP2 and VP3 Is Required for SV40 Propagation. *Journal of Biological Chemistry*. **288**(4), pp. 2510-2520. (Je V textu?)

**Goetz, G., S., Dean, F., B., Hurwitz, J., Matson, S., W., (1988).** The Unwinding of Duplex Regions in DNA by the Simian Virus 40 Large Tumor Antigen-associated DNA Helicase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. **5**(1):383-92.

- Greenfield N., J., Stafford, W., F., Hitchcock-DeGregori, S., E., (1994).** The effect of N-terminal acetylation on the structure of an N-terminal tropomyosin peptide and  $\alpha\alpha$ -tropomyosin. *Protein Science*. **3**(3), pp. 402-410.
- Guo, H., Zhang, J., Wang, Y., Bu, C., Zhou, Y., Fang, Q., (2017).** Comparative Proteomic Analysis of Lysine Acetylation in Fish CIK Cells Infected with Aquareovirus. *International Journal of Molecular Sciences*. **18**(11).
- Hai, Y., Christianson D, W., (2016)** Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature Chemical Biology*. **12** (9), pp. 741-747.
- Hard, R., L., Liu, J., Shen, J., Zhou, P., Pei, D., (2010).** HDAC6 and Ubp-M BUZ Domains Recognize Specific C-Terminal Sequences of Proteins. *Biochemistry*. **49**(50), pp. 10737-10746
- Hatakeyama, D., Shoji, M., Yamayoshi, S., Yoh, R., Ohmi, N., Takenaka, S., Saitoh, A., Arakaki, Y., Masuda, A., Komatsu, T., Nagano, R., Nakano, M., Noda, T., Kawaoka, Y., Kuzuhara, T., (2018).** Influenza A virus nucleoprotein is acetylated by histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *Journal of Biological Chemistry*. **293** (19), pp. 7126-7138.
- Hatakeyama, D., Ohmi, N., Saitoh, A., Makiyama, K., Morioka M., Okazaki, H., Kuzuhara, T., (2018).** Acetylation of lysine residues in the recombinant nucleoprotein and VP40 matrix protein of Zaire Ebolavirus by eukaryotic histone acetyltransferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **504** (4), pp. 635-640.
- Haynes, J., I., Chang, D., Consigli, R., A., (1993).** Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *Journal of Virology* **67**(5), pp. 2486-2495.
- Hook, S., S., Orian, A., Cowley S., M., Eisenman, R., N., (2002).** Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**(21), pp. 13425-13430.
- Horníková, L., Fraiberk, M., Man, P., Janovec, V., Forstová J., (2017)** VP 1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *The FEBS Journal*. **284** (2), pp. 301-323.
- Horníková, L., Bruštková, K., Ryabchenko, B., Zhernov, I., Fraiberk, M., Mariničová, Z., Lánský, Z., Forstová, J., (2020).** The Major Capsid Protein, VP1, of the Mouse Polyomavirus Stimulates the Activity of Tubulin Acetyltransferase 1 by Microtubule Stabilization. *Viruses*. **12**(2).
- Howe, F., S., Boubriak, I., Sale, M., J., Nair, A., Clynes, D., Grijsenhout, A., Murray, S., C., Woloszczuk, R., Mellor, J., (2014).** Acetylation Controls Local Protein Conformation by Influencing Proline Isomerization. *Molecular Cell*. **55**(5), pp. 733-744.
- Huang Y., L., Wang, M., Ou W., C., Fung C., Y., Chen, L., S., Chang, D., (2003).** Analysis of DNA-Binding Activity of the JC Virus Minor Capsid Protein VP2. *Journal of Neurovirology*. **9**(s1), pp. 21-24.
- Hurdiss, D., L., Morgan, E., L., Thompson, R., F., Prescott, E., L., Panou M., M., Macdonald A., Ranson N., A., (2016).** New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure*. **24**(4), pp. 528-536.
- Huerfano, S., Zila, V., Boura, E., Spanielová, H., Stokrová, J., Forstová, J., (2010).** Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal*. **277**(5), pp. 1270-1283.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X., F., Yao, TP., (2002).** HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. **417**(6887), pp. 455-458.
- Husain, M., Harrod, K., S., (2011).** Enhanced acetylation of alpha-tubulin in influenza A virus infected epithelial cells. *FEBS Letters*. **585**(1), pp. 128-132.

- Husain, M., Harrod S., K., (2009).** Influenza A virus-induced caspase-3 cleaves the histone deacetylase 6 in infected epithelial cells. *FEBS Letters*. **583** (15), pp. 2517-2520.
- Hwang, C., S., Shemorry, A., Varshavsky, A., (2010).** N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals. *Science*. **327**(5968), pp. 973-977.
- Iwata, A., Riley, B., E., Johnston, J., A., Kopito, R., R., (2005).** HDAC6 and Microtubules Are Required for Autophagic Degradation of Aggregated Huntingtin. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(48), pp. 40282-40292. (je to v textu?)
- Jia, Y., J., Liu, Z., B., Wang, W., G., Sun, C., B., Wei, P., Yang, Y., L., You, M., J., Yu, B., H., Li, X., Q., Zhou, X., Y., (2018).** HDAC6 regulates microRNA-27b that suppresses proliferation, promotes apoptosis and target MET in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. **32**(3), pp. 703-711. (je v textu?)
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J., J., McLaurin, A., Vance, J., M., Ito, A., Yao, T., P., (2003).** The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell*. **115**(6), pp. 727-738.
- Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Polevoda, B., Sherman, F., Hirano, H., (2000).** N  $\alpha$  -Acetylation and Proteolytic Activity of the Yeast 20 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(7), pp.4635-4639
- Kimura, Y., Saeki, Y., Yokosawa, H., Polevoda, B., Sherman, F., Hirano, H., (2003).** N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **409**(2), pp. 341-348.
- Kiernan, R., E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K., T., Benkirane, M., Van Lint, C., (1999?).** HIV-1 Tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *The EMBO Journal*. **18**(21), pp. 6106-6118.
- Krauzewicz, N., Streuli, C., H., Stuart-Smith, N., Jones, M., D., Wallace, S., Griffin, B., E., (1990).** Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *Journal of Virology*. **64**(9), pp. 4414-4420.
- Kwon, S., Zhang, Y., Matthias, P., (2007).** The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes & Development*. **21**(24), pp. 3381-3394.
- Kwun, H., J., Shuda, M., Feng, H., Camacho, C., J., Moore, P., S., Chang, Y., (2013).** Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Controls Viral Replication and Oncoprotein Expression by Targeting the Cellular Ubiquitin Ligase SCFFbw7. *Cell Host & Microbe*. **14**(2), pp. 125-135.
- Lee, J., Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y., S., Pandey, U., B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., J., Taylor, P., Cuervo, A., M., Yao, T., P., (2010).** HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal*. **29**(5), pp. 969-980.
- Legros, S., Boxus, M., Gatot, J., S., Van Lint, C., Kruys V., Kettmann, R., Twizere, J., C., Dequiedt, F., (2011).** The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene*. **30** (38), pp. 4050-4062.
- Leyk, J., Goldbaum, O., Noack, M., Richter-Landsberg, C., (2015).** Inhibition of HDAC6 Modifies Tau Inclusion Body Formation and Impairs Autophagic Clearance. *Journal of Molecular Neuroscience*. **55**(4), pp. 1031-1046.
- Lévy, L., Wei, Y., Labalette, C., Wu, Y., Renard, C., A., Buendia, M., A., Neuveut, C., (2004).** Acetylation of  $\beta$ -Catenin by p300 Regulates  $\beta$ -Catenin-Tcf4 Interaction. *Molecular and Cellular Biology*. **24**(8), pp. 3404-3414.



- Li, M., S. E. Delos, L. Montross a R. L. Garcea (1995a)** Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells., *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92** (13), pp. 5992-5996.
- Li, M., Lyon, M., K., Garcea, R., L., (1995b).** In Vitro Phosphorylation of the Polyomavirus Major Capsid Protein VP1 on Serine 66 by Casein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry*. **270** (43), pp. 26006-26011.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., Forstová, J., (2006).** Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology*. 2006, **80**(9), pp. 4610-4622. (replikační cyklus)
- Liddington, R., C., Yan, Y., Moulain, J., Sahli, R., Benjamin, T., L., Harrison, S., C., (1991).** Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. **354**(6351), pp. 278-284. (strukturní protein VP1)
- Liu, J., Gu, J., Feng, Z., Yang, Y., Zhu, N., Lu, W., Qi, F., (2016).** Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells. *Journal of Translational Medicine*. **14**(1).
- Ludlow, JW., Consigli, RA., (1987c).** Differences in biological activity and structural protein VP1 phosphorylation of polyomavirus progeny resulting from infection of primary mouse kidney and primary mouse embryo cell cultures. *Journal of Virology*. **61**(2), pp. 509-515.
- Ludlow J., W., Consigli, R., A., (1987a).** Localization of calcium on the polyomavirus VP1 capsid protein. *Journal of Virology*. **61**(9), pp. 2934-2937.
- Ludlow, J., W., Consigli, R., A., (1987b).** Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration. *Journal of Virology*. **61**(5), pp. 1708-1711.
- Ludlow, J., W., Consigli, R., A., (1989).** Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus. *Journal of Virology*. **63**(6), pp. 2881-2884.
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B., E., Forstová, J., (2002a).** Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology*. **83**(9), pp. 2309-2319.
- Mannová, P., Forstová, J., (2002b).** VP2/vp3 Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *Journal of Virology*. **77**(3), 1672-1681.
- Maltsev, A., S., Ying, J., Bax A., (2012).** Impact of N-Terminal Acetylation of  $\alpha$ -Synuclein on Its Random Coil and Lipid Binding Properties. *Biochemistry*. **51**(25), pp. 5004-5013.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Pujol, J., Bachs, O., (2010).** Acetylation of cyclin A: a new cell cycle regulatory mechanism. *Biochemical Society Transactions*. **38**(1), pp. 83-86.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., Yoshida, M., (2003).** In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*. **21**(24), pp. 6820-6831.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., Fukamizu, A., (2005).** Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**(32), pp. 11278-11283.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R., B., Mamon, H., Caspar, D., L., D., Garcea, R., L. (1991).** Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology*. **65**(9), pp. 4991-4998. (viru podobné částice )
- Moreland, R., B., Garcea, R., L., (1991a).** Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology*. **185**(1), pp. 513-518.

- Moreland, R., B., Montross, L., Garcea, R., L., (1991b)** Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of Virology*. **65**(3), pp. 1168-1176.
- Moses, K., Prives, C., (1994).** A unique subpopulation of murine DNA polymerase alpha/primase specifically interacts with polyomavirus T antigen and stimulates DNA replication. *Molecular and Cellular Biology*. 1994, **14**(4), pp. 2767-2776.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J., E., Ott, M., Verdin, E., Zhou, M., M., (2002).** Structural Basis of Lysine-Acetylated HIV-1 Tat Recognition by PCAF Bromodomain. *Molecular Cell*. **9**(3), pp. 575-586.
- Mullane, K., P., Ratnofsky, M., Culleré, X., Schaffhausen, B., (1998).** Signaling from Polyomavirus Middle T and Small T Defines Different Roles for Protein Phosphatase 2A. *Molecular and Cellular Biology*. **18**(12), pp. 7556-7564.
- Munoz-Fontela, C., González, D., Marcos-Villar, L., Campagna, M., Gallego, P., González-Santamaría, J., Herranz, D., Gu, W., Serrano, M., Aaronson, S., A., Rivas, C., (2011).** Acetylation is indispensable for p53 antiviral activity. *Cell Cycle*. **10**(21), pp. 3701-3705.
- Murray-Nerger, L., A., Sheng, X., Cristea, I., M., (2018).** Orchestration of protein acetylation as a toggle for cellular defense and virus replication. *Nature Communications*. **9**(1).
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu, H., (2002).** Interaction of the Vp3 Nuclear Localization Signal with the Importin  $\alpha$ 2/ $\beta$  Heterodimer Directs Nuclear Entry of Infecting Simian Virus 40. *Journal of Virology*. **76**(18), pp. 9368-9377.
- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P., P., Handa, H., Liddington, R., C., Kasamatsu, H., (2007).** Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome. *Journal of Virology*. **81**(8), pp. 3778-3785.
- Palková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J., (2000a).** Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters*. **478**(3), pp. 281-289
- Palková, Z., Španielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, A. (2000b):** The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Letters*. **467**(2-3), pp. 359-364.
- Pandey, U., B., Batlevi, Y., Baehrecke, E., H., Taylor, J., P., (2014).** HDAC6 at the Intersection of Autophagy, the Ubiquitin-proteasome System, and Neurodegeneration. *Autophagy*. **3**(6), pp. 643-645.
- Park, S., E., Kim J., M., Seok, O., H., Cho, H., Wadas, B., Kim, S., Y., Varshavsky, A., Hwang C., S., (2015).** Control of mammalian G protein signaling by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Science*. **347**(6227), pp. 1249-1252.
- Polevoda, B., Sherman, F., (2003).** Composition and function of the eukaryotic N-terminal acetyltransferase subunits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **308**(1), pp. 1-11.
- Ponder, B., A., Robbins, A., K., Crawford, L., V., (1977).** Phosphorylation of Polyoma and SV40 Virus Proteins. *Journal of General Virology*. **37**(1), pp. 75-83.
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., Nachury, M., V., (2017).** Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nature Cell Biology*. **19**(4), pp. 391-398.
- Ruzafa, D, Hernandez-Gomez, Y., S., Bisello, G., Broersen, K., Morel, B., Conejero-Lara, F., (2017).** The influence of N-terminal acetylation on micelle-induced conformational changes and aggregation of  $\alpha$ -Synuclein. *PLOS ONE*. **12**(5), e0178576.

- Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S., L., Yoshida M, Toi, M., (2005).** Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*. **24**(28), pp. 4531-4539.
- Shemorry, A., Hwang C., S., Varshavsky, A., (2013).** Control of Protein Quality and Stoichiometries by N-Terminal Acetylation and the N-End Rule Pathway. *Molecular Cell*. 2013, **50**(4), pp. 540-551.
- Salunke, D., M., Caspar, D., L., D., Garcea, R., L., (1986).** Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*. **46**(6), pp. 895-904.
- Salunke, D., M., Caspar, D., L., Garcea R., L., (1989).** Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal*. **56**(5), pp. 887-900.
- Saribas, A., S., Mun, S., Johnson, J., El-Hajmoussa, M., White, M., K., Safak, M., (2014).** Human polyoma JC virus minor capsid proteins, VP2 and VP3, enhance large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: Evidence for their involvement in regulation of the viral DNA replication. *Virology*. **449**, pp. 1-16.
- Schowalter, R., M., Buck, C., B., Imperiale, M., J., (2013).** The Merkel Cell Polyomavirus Minor Capsid Protein. *PLoS Pathogens*. **9** (8).
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., Yasui, K., (2004).** Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *Journal of Virology*. **78**(18), pp. 9890-9903.
- Skultetyova, L., Ustinova, K., Kutil, Z., Novakova, Z., Pavlicek, J., Mikesova, J., Trapl, D., Baranova, P., Havlinova, B., Hubalek, M., Lansky, Z., Barinka, C., (2017).** Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Scientific Reports*. **7**(1).
- 26. Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová J., Huérfano S., (2018).** Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses*. **10**(4).
- Soppina, V.; Herbstman, J., F., Skiniotis, G., Verhey, K., J., (2012).** Luminal Localization of  $\alpha$ -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE*. **7**(10).
- Soutoglou, E., Katrakili, N., Talianidis, I., (2000).** Acetylation Regulates Transcription Factor Activity at Multiple Levels. *Molecular Cell*. **5**(4), pp. 745-751. (ověřit radši jestli je v textu )
- Spanielová, H., Fraiberk, M., Suchanová, J., Soukup, J., Forstová, J., (2014).** The encapsidation of polyomavirus is not defined by a sequence-specific encapsidation signal. *Virology*. **450-451**, pp. 122-131.
- Spilianakis, C., Papamatheakis, J., Androniki Kretsovali (2000).** Acetylation by PCAF Enhances CIITA Nuclear Accumulation and Transactivation of Major Histocompatibility Complex Class II Genes. *Molecular and Cellular Biology*. **20**(22), pp. 8489-8498.
- Stehle, T., Gamblin, S., J., Yan, Y., Harrison, S., C., (1996).** The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure*. 1996, **4**(2), pp. 165-182.
- Stehle, T., C.Harrison, S., C., (1997).** High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *The EMBO Journal* [online]. **16**(16), pp. 5139-5148.
- Tsai, B., Gilbert, J., M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin T., L., Rapoport, T., A., (2003).** Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *The EMBO Journal*. **22**(17), pp. 4346-4355. (replikační cyklus)

**Valle, M., Gruss, C., Halmer, L., Carazo, J., M., Donate L., E., (2000).** Large T-Antigen Double Hexamers Imaged at the Simian Virus 40 Origin of Replication. *Molecular and Cellular Biology*. 2000, **20**(1), pp. 34-41.

**Váňová J, Hejtmánková A, Žáčková Suchanová J, Sauerová P, Forstová J, Hubálek Kalbáčová M, Španielová H (2020).** Influence of cell-penetrating peptides on the activity and stability of virus-based nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, **576**.

**Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M., P., Rousseaux, S., Lemercier, C., Yoshida, M., Khochbin, S., (2000).** Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current Biology*. **10**(12), pp. 747-749.

**Voelter-Mahlknecht, S., Mahlknecht, U., (2003).** Cloning and structural characterization of the human histone deacetylase 6 gene. *International Journal of Molecular Medicine*. **12**(1), pp. 87-93.

**Wang, E., H., Prives, C., (1991).** DNA helicase and duplex DNA fragment unwinding activities of polyoma and simian virus 40 large T antigen display similarities and differences. *The Journal of Biological Chemistry*. **5**(19), pp. 12668-75.

**Wang, Y., Shi, Z., Y., Feng, J., Cao, J., K., (2018).** HDAC6 regulates dental mesenchymal stem cells and osteoclast differentiation. *BMC Oral Health*. **18**(1).

**Wenzel, E., D., Speidell, A., Flowers, S., A., Wu, C., Avdoshina, V., Mochetti, I., (2019).** Histone deacetylase 6 inhibition rescues axonal transport impairments and prevents the neurotoxicity of HIV-1 envelope protein gp120. *Cell Death & Disease*. **10**(9).

**Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M., P., Théry, M., Nachury, M., V., (2017).** Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science*. **356**(6335), pp. 328-332.

**Yan, B., Xie, S., Liu, Z., Ran, J., Li, Y., Wang, J., Yang, Y., Zhou, J., Li, D., Liu, M., (2014).** HDAC6 Deacetylase Activity Is Critical for Lipopolysaccharide-Induced Activation of Macrophages. *PLoS ONE*. **9**(10), e110718.

**Yan, B., Liu, Y., Bai, H., Chen, M., Xie, S., Li, D., Liu, M., Zhou, J., (2017).** HDAC6 regulates IL-17 expression in T lymphocytes: implications for HDAC6-targeted therapies. *Theranostics*. **7**(4), pp. 1002-1009.

**Yin, Z., Xu, W., Xu, H., Zheng, J., Gu, Y., (2018).** Overexpression of HDAC6 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by inhibition of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. **16**(6), pp. 7082-7090.

**Yuan, Z., L., Guan, Y., J., Chatterjee, D., Chin, Y., E., (2005).** Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science*. **307**(5707), pp. 269-273.

**Yuen L., K., Consigli R., A., (1985).** Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. *Virology*. **144**(1), pp. 127-138

**Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., Matthias, P., (2003).** HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal*. **22**(5), pp. 1168-1179.

**Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S., Matthias, P., (2006).** Two Catalytic Domains Are Required for Protein Deacetylation. *Journal of Biological Chemistry*. **281**(5), pp. 2401-2404.

**Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J., T., Yang X., J., Dent, S., R., Yao, T., P., Lane, W., S., Seto, E., (2007)** HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell*. **27**(2), pp. 197-213.

**Zhang, J., Tan, J., Hu, Z., Chen, C., Zeng, L., (2019).** HDAC6 Inhibition Protects against OGDR-Induced Golgi Fragmentation and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**, pp. 1-12.

**Zheng, K., Jiang, Y., He, Z., Kitazato, K., Wang, Y., (2017).** Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *Journal of General Virology*. **98**(3), pp. 322-337.

**Zhou, A., Y., Ichaso, N., Adamarek, A., Zila, V., Forstova, J., Dibb, N., J., Dilworth, S., M., (2011).** Polyomavirus Middle T-Antigen Is a Transmembrane Protein That Binds Signaling Proteins in Discrete Subcellular Membrane Sites. *Journal of Virology*. **85**(7), pp. 3046-3054.

**Eva Bílková (2014): Studium vlastností minoritních strukturních proteinů myšího polyomaviru.** Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

**Karolína Řípová (2002): Arteficiální kapsidy myšího polyomaviru a jejich interakce s hostitelskou buňkou.** Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

**Zuzana Richterová (2002): Kapsidové struktury tvořené pozdními strukturními proteiny polyomaviru a jejich osud v hostitelských buňkách.** Disertační práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.